

DNS schädigende Eigenschaften von Zementpartikeln auf primäre Oropharyngealzellen bei Personen mit Malignomen der oberen Atemwege

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ariane Ollmann
aus Friedberg/Hessen

Gießen 2011

Aus dem Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
unter der Leitung von : Prof. Dr. V. Mersch-Sundermann

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Mersch-Sundermann
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Eikmann

Tag der Disputation: 22.08.2011

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
Bap	Benz[o]apryene
BAT	Biologische Arbeitsstofftoleranz
BK-Rente	Berufskrankheiten-Rente
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CB	Cytokinese-Block-Method, Cytokinin-Block-Methode
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease, Chronisch-Obstruktive Lungenerkrankung
d.h.	Das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleidacid, Desoxyribonukleinsäure
DQ 12	Dörentruper Quarz 12
et al.	Et alii, und andere
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FCS	Fötales Kälberserum
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GBS	Granuläre Biobeständige Stäube
ggf.	Gegebenenfalls
g	Gramm
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Hora, Stunde
HCL	Salzsäure
IARC	International Agency For Research On Cancer
KCL	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KSF-Medium	Keratinocyte-SFM (Serumfreemedium) Medium, Serumfreies Keratinocyten Medium
M	Molar
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MMAD	Mass median Aerodynamic Diameter
M.-%	Massenprozent
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
$\cdot\text{OH}$	Hydroxylradikal
OR	Odd ratio, Chancenverhältnis
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
OTM	Olive Tail Moment
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
pEC	Primary epithelial cells, primäre Epithelzellen
PEF	Peak expiratory flow
PBS	Phosphate-Buffered Saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
ppm	Parts per million
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PM	Particulate Matter, Feinstaub
rel. Luftf.	Relative Luftfeuchtigkeit
rpm	Rounds per minute
RLE	Rat liver epithelia, Rattenleberzellen
ROS	Reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
SCGE	Single Cell Gelelectrophoresis, Einzelzell-Gel-Elektrophorese
S.E.M.	Standard Error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
Surfactant	Surface active agent/Oberflächenaktive Substanz
TiO ₂	Titandioxid
TLV-TWA	Threshold Limit Value/Time Weighted Average
TRGS	Technische Regel für Gefahrstoffe
TRK	Technische Richtkonzentration
Tab.	Tabelle
u.a.	Unter anderem
z.T.	Zum Teil
°C	Grad Celsius
UDS	Unscheduled DNA Synthesis, unplanmäßige DNA Synthese
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
VK	Vitalkapazität
VDZ	Verein Deutscher Zementwerke
vs.	Versus, gegen

Abkürzungsverzeichnis

1.	Theoretische Einführung	1
1.1	Rhein-Neckar-Studie	1
1.2	Zement	2
1.2.1	Zusammensetzung und Herstellung von Zement	2
1.3	Durch Zement und Stäube verursachte Krankheiten	7
1.3.1	Zementdermatitis	7
1.3.2	COPD, Chronisch-Obstruktive Lungenerkrankung und Silikose	9
1.4	Experimentell nachgewiesene negative gesundheitliche Effekte von Zementstaub in der Lunge und den oberen Atemwegen	10
1.5	Larynx-Karzinome	12
1.6	Toxizität von Partikeln allgemein	13
1.7	Aufnahme von Zementpartikeln über die Atemluft	14
1.8	Comet Assay (Einzelzell-Gel-Elektrophorese, SCGE)	17
2.	Fragestellung	20
3.	Material und Methoden	21
3.1	Materialien und Hersteller	21
3.1.1	Lösungen	22
3.1.2	Primäre Epithelzellen	23
3.1.3	Zemente	25
3.1.4	Kontrollen	26
3.2	Zytotoxizität	29
3.3	Einzelzell-Gel-Elektrophorese	29
3.4	Statistische Analyse	32
4.	Ergebnisse	33
4.1	Vitalität der Primärzellen bei Ankunft in Giessen	33
4.1.1	Löseverhalten der untersuchten Partikel	33
4.1.2	Mikroskopisches Bild der Primärzellen nach vierstündiger Exposition	34
4.2	Zytotoxizität und DNA-Schäden	36
4.3	DNA-Migration im Comet Assay	44
5.	Diskussion	49
5.1	Widersprüchliche Daten in der Literatur	49
5.2	Reaktionen der verschiedenen Biopsieproben	50
5.3	Inhaltsstoffe von Zement	52
5.4	Partikel allgemein	57
5.5	Grenzen der angewandten Methode	60
5.6	Perspektiven	62
6.	Zusammenfassung	63
7.	Abstract	64

8.	Anhang	65
8.1	Einzelwerte der Comet Untersuchung	65
8.2	Induktionsfaktoren der DNA-Migration in pEC durch die Prüfsubstanzen im Vergleich zur Mediumkontrolle	70
8.3	Literaturübersicht über Effekte von Zementstaub	71
	Literaturverzeichnis	74
	Erklärung	
	Danksagung	

1. Theoretische Einführung

Der menschliche Organismus ist heute einer Vielzahl von Umwelteinflüssen ausgesetzt, von denen viele gesundheitliche Schäden verursachen oder in diesem Verdacht stehen.

Solchen Stoffen begegnet man häufig und intensiv im Arbeitsalltag, wo zwar Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden, aber nicht alle Gefahren gemieden werden können.

Zum Beispiel kommen Angestellte bei der Herstellung von Zement und Bauarbeiter bei der Verarbeitung von Zement häufig in Kontakt mit dessen Staub. Diese feinen Partikel können über die Atemluft aufgenommen werden und in den Respirationsbereich eindringen (FAIRHURST et al., 2005; OLERU, 1984).

Eine mögliche Art der Schädigung des Organismus auf Zellebene ist die gentoxische Veränderung von genetischem Material, wobei die Erbsubstanz (DNA) derart verändert wird, dass es zur Entstehung von Tumoren kommen kann. In einer Fall-Kontroll-Studie aus dem Rhein-Neckar-Kreis konnte ein Zusammenhang zwischen der Exposition mit Zementpartikeln und Effekten im Bereich der Atemwege mit der Folge von Atemwegs-Obstruktionen und der Entwicklung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich bei Bauarbeitern nachgewiesen werden (BECHER & DIETZ et al., 2002).

Toxikologische Daten hinsichtlich von möglichen partikelinduzierten Effekten auf der Zellebene fehlen bis heute.

1.1 Rhein-Neckar Studie

Im Mai 1998 begann die weltweit größte Fall-Kontroll-Studie zur molekularen Epidemiologie des Larynxkarzinoms in der Rhein-Neckar-Odenwald Region in Süddeutschland. Sie hatte zum Ziel, beruflich bedingte Risiken zu erforschen, die eine Entstehung von Kehlkopfkrebs begünstigen. Im Dezember 2000 lagen schließlich die anhand von Fragebögen gewonnenen Ergebnisse von 257 Krebspatienten und 769 Kontrollpersonen vor. Man fand heraus, dass im Allgemeinen das Rauchen von Tabak und der Konsum von Alkohol zu den Hauptrisikofaktoren für eine Krebserkrankung im Atemwegsbereich bei Bauarbeitern und Konstrukteuren zählt, dieses Risiko jedoch durch eine jahrelange Belastung mit diversen Staubpartikeln erhöht wird. Bei Probanden, die auf dem Arbeitsplatz Zementstaub ausgesetzt

waren, wurde eine erhöhte Erkrankungsrate ermittelt (Odd ratio = 2,42). Aufgrund dieser Ergebnisse ergibt sich auch dann ein erhöhtes Risiko, durch die Exposition mit Zementstaub an Krebs zu erkranken, wenn bei der Berechnung die Risikofaktoren Tabak-, Alkoholkonsum und Lebensstandard vernachlässigt werden (BECHER & DIETZ et al., 2002; DIETZ, 2002; DIETZ et al., 2004).

Diese Schlussfolgerung war Auslöser für das Interesse an der Wirkung von Zementstaub auf zellulärer Ebene und dem damit verbundenen Prozess der Tumorentstehung bei Kehlkopfkrebs.

1.2 Zement

Zement ist ein Massenbaustoff der Steine- und Erden-Industrie. Er wird aus natürlich vorkommenden Rohstoffen hergestellt und je nach Anspruch der Bauindustrie mit geeigneten Nebenprodukten anderer Industrien versetzt. Die verschiedenen Rohstoffvorkommen unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und beeinflussen somit auch die Herstellung und die bautechnischen Eigenschaften des Zementes. Dabei können fehlende Komponenten dem Ausgangsstoff zugesetzt werden, aber unerwünschte Bestandteile, die nur in geringen Mengen vorkommen oder fein verteilt sind, können aus wirtschaftlichen und technischen Gründen den Rohstoffen vor der Verarbeitung nicht entzogen werden. Wichtige Eigenschaften des Zementes wie z.B. seine Festigkeit, der Wasseranspruch, das Erstarren und die Raumbeständigkeit können heute durch ausgereifte Herstellungstechniken zuverlässig eingestellt werden.

1.2.1 Zusammensetzung und Herstellung von Zement

Die ersten Zemente tauchten bereits im 3. Jahrhundert v.Chr. bei den Römern auf. Seit dem 19. Jahrhundert bildet der Portlandzementklinker den Hauptbestandteil bei den heute in Deutschland hergestellten Zementen. Portlandzementklinker wird aus einem Rohstoffgemisch aus Kalkstein, Kreide, Ton oder dem natürlichen Gemisch von Kalkstein und Ton, dem Kalksteinmergel, durch einen Verbrennungsprozess hergestellt. Um die nötigen Reaktionen beim Brennvorgang ablaufen zu lassen, sind bestimmte Bestandteile nötig.

Dabei sind die Hauptbestandteile des Kalksteins, der durch Ablagerungen im Jurameer vor 190 Millionen Jahren entstand, und der Kreide Calciumcarbonat $[\text{CaCO}_3]$ und Calciumoxid (Kalk $[\text{CaO}]$). In den Tonvorkommen dagegen findet man neben geringen Mengen an Quarz (Siliziumdioxid, SiO_2), Feldspat, Eisenoxid $[\text{Fe}_2\text{O}_3]$, Eisenhydroxid (FeOOH) oder Pyrit/Markasit (FeS_2) die feinkörnigen Tonminerale. Sie bestehen aus Siliziumdioxid (Kieselsäure $[\text{SiO}_2]$), Aluminiumoxid (Tonerde $[\text{Al}_2\text{O}_3]$) und den Alkalioxiden K_2O und Na_2O (Tab. 1). Als Spurenelement findet man z.B. Chrom (2 – 20 ppm) (PISTERS, 1966).

Tab.1: Bestandteile der Zementrohstoffe.

ROHSTOFFE	BESTANDTEILE
KALKSTEIN, KREIDE	<ul style="list-style-type: none">• CALCIUMCARBONAT - CaCO_3• CALCIUMOXID (Kalk) – CaO• SPURENELEMENTE (Schwermetalle, z.B.Chrom)
TON	<ul style="list-style-type: none">• QUARZ (Siliziumdioxid, Kieselsäure) SiO_2• FELDSPAT• EISENOXID - Fe_2O_3• PYRIT/MARKASIT - FeS_2• SILICIUMDIOXID (Kieselsäure) - SiO_2• ALUMINIUMOXID (Tonerde) - Al_2O_3• EISENHYDROXID – FeOOH• ALKALIOXIDE - K_2O , Na_2O• SPURENELEMENTE (Schwermetalle, z.B.Chrom)

Die Zementrohstoffe, die in Steinbrüchen gewonnen werden, müssen im ersten Schritt in Rohr- oder Wälzmühlen zermahlen werden. Manchmal müssen Korrekturkomponenten wie Quarzsand oder Eisenerz zugegeben werden.

Das gewonnene Rohstoffgemisch wird anschließend im Drehofen auf bis zu 1450°C erhitzt, wobei sich neue Verbindungen bilden (Klinkerphasen, Tab. 2), wie z.B. Calciumsilicate und Calciumaluminat, die für die typische Eigenschaft der hydraulischen Erhärtung (unter

Wasserzufuhr) von Zement verantwortlich sind. Die Klinkerkörner haben eine fein- bis grobstückige Struktur bis zu einem Korngrößenbereich von unter 50 mm.

Tab.2: Phasenzusammensetzung des Zementklinkers

Klinkerphasen	Chemische Formeln	Kurzbezeichnung
Tricalciumsilicat (Alit*)	$3 \text{ CaO} \cdot \text{SiO}_2$	C_3S
Dicalciumsilicat (Belit*)	$2 \text{ Ca} \cdot \text{SiO}_2$	C_2S
Calciumaluminatferrit	$2 \text{ CaO} \cdot (\text{Al}_2\text{O}_3, \text{Fe}_2\text{O}_3)$	$\text{C}_2(\text{A},\text{F})$
Tricalciumaluminat	$3 \text{ CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$	C_3A
Freies Calciumoxid	CaO	
Freies Magnesiumoxid (Periklas)	MgO	

*Alit und Belit bezeichnen die reinen Silicate, die frei von Aluminium-, Eisen- und Magnesiumoxid sind.

Die europäische Zementnorm DIN EN 197-1 für Normalzemente vom 01.04.2001 unterscheidet insgesamt 27 Zementarten mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und erlaubt die Zugabe von anorganischen und mineralischen Nebenbestandteilen bis zu 5 M.-%. Als solche Nebenbestandteile dürfen Hüttensand, Puzzolane, Flugasche, gebrannter Schiefer und/oder ungebrannte oder teilweise gebrannte Grundstoffe der Klinkerproduktion (Rohmehl) verwendet werden.

So können in Portlandhüttenzementen (CEM II-S) zusätzlich bis zu 35 M.-% Hüttensand enthalten sein und in Hochofenzementen (CEM III) etwa 36 – 95 M.-%. Sie werden durch gemeinsames Mahlen von Hüttensand, Portlandzementklinkern und Sulfatträgern (ein Gemisch aus Gips und Anhydrit, welches für ein optimales Erstarrungsverhalten des Zementes sorgen soll) hergestellt. Der Hüttensand stammt aus der Roheisenproduktion, bei der aus Gangart, Koksasche und Zuschlägen als Nebenprodukt die Hochofenschlacke entsteht. Diese 1500°C heiße, basische und flüssige Schlacke wird schnell auf ca. 100°C herabgekühlt, damit der Hüttensand mit einer Körnung von bis zu einigen mm entsteht (Granulation).

Der Glasgehalt von Hüttensand, der im Wesentlichen die hydraulischen Eigenschaften des Zementes bestimmt, muss nach Zementnorm DIN EN 197-1 mindestens zwei Drittel betragen. Durch den Hüttensand verläuft die Anfangserhärtung des Zements langsamer, erreicht aber bei entsprechender Nachbehandlung eine höhere Nacherhärtung nach 28 Tagen als Portlandzemente.

In Deutschland sind 29% aller Zemente Portlandhüttenzemente und Hochofenzemente. Hüttsand ist einer der technisch wichtigsten Hauptbestandteile.

Manche Zemente enthalten Puzzolane (Trass, Sedimentgestein). Hierbei handelt es sich um ein vulkanisches Gesteismehl, das mit Calciumhydroxid zu einer erhärtungsfähigen Verbindung reagieren kann. Ihren Namen verdanken sie den bereits im Altertum verwendeten Tuffen von Pozzuoli bei Neapel. In Deutschland werden sie heute in der vorderen Eifel gewonnen (vulkanischer, rheinischer Tuff) und im Nördlinger Ries (bayrischer Trass = Suevit, entstanden durch Meteoriteneinschlag).

Ebenfalls puzzolanische Eigenschaften besitzt die Flugasche (feinkörnige, kugelförmige Glaspartikel), ein Verbrennungsrückstand aus Kohlekraftwerken, die bei der Herstellung von Beton zugesetzt wird.

Für Portlandschieferzement wird als Tonkomponente gebrannter Ölschiefer verwendet, was sich aber auf eine Region in Baden-Württemberg beschränkt. Der Ölschiefer besteht aus organischen Substanzen, Calciumcarbonat, Tonmineralien und Quarz.

Eine gute Füllwirkung im Zement wird durch Zugabe von Kalkstein bewirkt. Sein CaCO_3 Gehalt darf 75 M.-% nicht unterschreiten, um eine ausreichende Frostresistenz des Zements im Beton zu gewährleisten. Der damit hergestellte Portlandkalksteinzement hat eine größere Korngrößenverteilung als Portlandzement und hat deshalb bessere Verarbeitungseigenschaften. Eine gesteigerte Hohlraumfüllung durch einen erhöhten Anteil feiner Kalksteinteilchen führt zu der hohen Dauerhaftigkeit von Beton.

Dem gebrannten Klinker wird zur Steuerung des Erstarrungsverhaltens bei der Verarbeitung Calciumsulfat (Gipsstein oder Gips-Anhydrit) und ggf. weitere Hauptbestandteile zugefügt. Schließlich wird er in Zementmühlen zu Zement zermahlen.

Bei der Zementherstellung können luftgetragene Emissionen von Zementstaubpartikeln, Lärm und Erschütterungen als Belastungen von Anwohnern in der umliegenden Region und besonders der Arbeiter im Zementwerk auftreten. Durch moderne Filteranlagen liegen die Reingasstaubgehalte von Drehöfen heute zwischen 10 und 50 mg/m^3 (FORSCHUNGSINSTITUT DER ZEMENTINDUSTRIE DÜSSELDORF, 1998).

Die Occupational Safety and Health Administration (OSHA, 1989) gibt eine Höchstkonzentration in der Luft für Portlandzement von 15 mg/m^3 an, wenn der Zement weniger als 1 % an kristallinem Silika enthält. Der TLV-TWA (threshold limit value – time-weighted average; entspricht den deutschen MAK-Werten) liegt nach der ACGIH (AMERICAN

CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS, 1992) bei 10 mg/m³ für Partikel allgemein, für die einatembare Fraktion (Inhalierbare Partikel < 10 µm) bei 5 mg/m³ (www.cdc.gov).

Im Boden-, Pflanzen- und Blutproben von Anwohnern aus der näheren Umgebung (500 m) einer Zementfabrik konnten in einer Untersuchung von BURHANETTIN et al. (2006) höhere Konzentrationen von Cadmium nachgewiesen werden, als in Proben aus weiterer Entfernung (1000 m) oder anderen Gebieten.

In der Liste der weltweit größten Zementhersteller liegt Deutschland auf Rang 12 mit einer Produktion von 33,409 Mio t Zement pro Jahr. Auf Platz 1 liegt China mit 813,190 Mio t Zement. Von der deutschen Zementproduktion werden 16% mit der Hand verarbeitet, 32% werden zur Herstellung von Fertigbetonteilen verwendet und 52% werden zu Transportbeton verarbeitet (FISCHER WELTALMANACH, 2007).

Durch ihre stark basische Reaktion beim Anmachen mit Wasser werden Zemente als „reizend (X_i)“ eingestuft. Sackzement muss mit den entsprechenden Gefahrensätzen und Sicherheitsratschlägen gekennzeichnet sein.

Gefahrensätze:

R 38 Reizt die Haut

R 41 Gefahr ernster Augenschäden

R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich (nur bei nicht chromatreduziertem Zement)

Sicherheitsratschläge:

S2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen

S22 Staub nicht einatmen

S24 Berührung mit der Haut vermeiden

S26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser ausspülen und den Arzt konsultieren

S36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen

S37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen

S39 Bei der Arbeit geeignete Schutzbrille/Gesichtsmaske tragen

1.3 Durch Zement und Stäube verursachte Krankheiten

Dass Zement ein völlig bedenkenlos zu verarbeitender Stoff sei, wird durch etliche bereits durchgeführte Untersuchungen und langjährige Beobachtungen an erkrankten Arbeitern aus der Zementindustrie widerlegt. Dabei konnten verschiedenste gesundheitliche Beeinträchtigungen besonders durch die Verarbeitung von nassem Zement oder durch die Belastung mit Zementstaub diagnostiziert werden.

1.3.1 Zementdermatitis

Eine häufig durch Zement hervorgerufene epidermale Intoleranzreaktion ist die Zementdermatitis oder „Maurerkrätze“ bei Bauarbeitern, die häufigen und intensiven Hautkontakt mit Zement bei dessen Verarbeitung haben (5 – 15% der Maurer, Estrich- und Fliesenleger). Es handelt sich um eine irritative oder allergische Erkrankung mit einer Sensibilisierungsphase von bis zu 15 Jahren. Auch nach dem Abheilen dieses Berufsekzems kann es wieder auftreten, wenn es erneut zu Hautkontakt mit Zement bzw. Frischmörtel kommt (VEREIN DEUTSCHER ZEMENTWERKE E.V., 1999). Pro Jahr werden in Deutschland von der Berufsgenossenschaft insgesamt ca. 310 Fälle von zementverursachten Hauterkrankungen als Berufskrankheit anerkannt. Davon müssen ca. 130 Betroffene ihren Beruf aufgeben und mit einer BK-Rente entschädigt werden.

Die Symptome äußern sich im akuten Zustand mit primären und sekundären Hauteffloreszenzen: einer Rötung und Schwellung der Haut sowie entzündlichen Bläschen und Knötchen. Bei lang andauernden und sich ständig wiederholenden Irritationen durch Zementkontakt bildet sich letztendlich ein chronischer Entzündungszustand aus, das chronische Handekzem. Die Haut verdickt, reißt ein und bildet verstärkt Schuppen. Der ganze Prozess ist mit Schmerzen oder mit sehr quälendem Juckreiz verbunden.

Wird diese Reaktion durch die Verletzung der oberen Hornschicht durch mechanische Einflüsse (etwa Sandkörner, die die Haut reizen = irritativ), durch die Alkalität des Frischmörtels bzw. -betons (toxisch) und der damit verbundenen Durchlässigkeit für Krankheitserreger als auch der Chromat-Ionen im feuchten Zement ausgelöst, spricht man von einer irritativ-toxischen Zementdermatitis. Die Alkalität wird durch die Komponenten Calciumoxid

(CaO), Magnesiumoxid (MgO), Dinatriumoxid (Na₂O) und Dikaliumoxid (K₂O) hervorgerufen.

Zement ist mit pH-Werten über 13 im Verarbeitungszustand ausgesprochen alkalisch und kann auf der ungeschützten Haut juckende und nässende Ekzeme, im Extremfall aber auch Verätzungen hervorrufen (AMBROSIUS, 2000).

Besonders schädlich sind in diesem Falle die Chromate im Zement. Seit 1997 ist Chrom(VI) anerkannt als humanes Karzinogen (Gruppe 1) (IARC, 1997). Bei den Chromaten handelt es sich um Verunreinigungen, besonders aus den tonhaltigen Rohstoffen, die keine technische Auswirkung auf das fertige Zementprodukt haben. Durch monatelangen oder gar jahrelangen Hautkontakt mit solchen wasserlöslichen Chromaten kann die unangenehmste und häufigste Form der Maurerkrätze entstehen, die allergische Chromatdermatitis. Durch eine Sensibilisierung reichen bereits kleinste Mengen an Zement, um neue Ekzemschübe auszulösen. Sie macht bis zu 90 Prozent aller zementbedingten Hautkrankheiten aus (ABDERHALDEN, 1999).

Entgegenwirken kann man dem Zementekzem nur durch die Kombination dreier Schutzmaßnahmen: Schutzhandschuhe (nitrilgetränkte, weiße Bauhandschuhe), Hautschutz und konsequenter Einsatz von chromatarmen Zementen. So darf der Chromatgehalt von Sackzementen und zementhaltigen Zubereitungen (Fliesenkleber, Spachtelmasse, Werkfrisch- und Werk trockenmörtel) 0,0002 % (2 ppm) an wasserlöslichem Chrom(VI)-Gehalt in Bezug auf die Trockenmasse (2 mg/kg) nicht überschreiten (AMTSBLATT DER EUOPÄISCHEN UNION, 2003). Dies wird auf den Produkten durch den Aufdruck **Chromatarm gemäß TRGS 613** gekennzeichnet (BERUFGENOSSENSCHAFTLICHES INSTITUT FÜR ARBEITSSICHERHEIT, BIA 1993). Dieser Zement ist mit Reduktionsmitteln (z.B. Eisen(II)-Sulfat) versetzt, wodurch das bei der Sinterung entstehende allergieauslösende, wasserlösliche, sechswertige Chrom (in Verbindung mit Sauerstoff Chromat, CrO₄²⁻) zum dreiwertigen Chrom reduziert wird.

Bei den in Deutschland bisher produzierten Zementsorten ist der Gehalt an wasserlöslichen Chromaten oft trotzdem sehr hoch. In manchen Fällen beträgt er bis zu 25 ppm. Einige in Deutschland verwendete Zemente aus Polen oder Tschechien weisen mit bis zu 40 ppm sogar noch höhere Werte auf.

Trockenmörtel, die allesamt aus Silozement hergestellt werden und deren Einsatz immer noch zunimmt, haben einen erhöhten Anteil an Chromat.

1.3.2 COPD, Chronisch-Obstruktive Lungenerkrankung und Silikose

Die COPD oder Chronisch-Obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease) wird in 90 % aller Fälle durch starken Nikotinkonsum verursacht. Aber auch die starke und lange Exposition gegenüber Stäuben wie die des Zementes, besonders am Arbeitsplatz, kann das Risiko an COPD zu erkranken, erhöhen (BECKLAKE, 1989, 1994). Durch die Zerstörung der Flimmerhärchen und der Schleimhaut der kleinen Lungenbläschen kommt es zu inflammatorischen Prozessen in der Bronchialschleimhaut, wodurch die Luftwege verengen. Ein erhöhter Atemwiderstand und eine geringe Lungenentfaltung führen zu Atemnot, Mattigkeit, erschwertem Abhusten von zähem Schleim, Sekundärinfektionen und manchmal zu einem Cor pulmonale (Rechtsherzinsuffizienz, Vergrößerung und Schwächung der rechten Herzhälfte).

Eine weitere typische Erkrankung der Lunge, die durch Staubexposition verursacht werden kann, ist die Silikose. Sie dürfte aber im Zusammenhang mit Zement, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielen, da die Verbindung zu Zement nur durch den Gehalt an Quarz in mineralischen Mischstäuben wie z.B. in Kohlenstaub, Talkum und auch Zement zu ziehen ist. Die Silikose ist eine Staublungenerkrankung (Pneumokoniose) mit einer Bindegewebsneubildung, die durch Inhalation und Ablagerung von mineralischem Staub, insbesondere quarzhaltigem Staub, verursacht wird. Es kommt zur Bildung von knotenartigen Bindegewebsneubildungen, die zu Vernarbung der Lungen, Luftnot, Husten, Verschleimung, chronischer Bronchitis und später zum Tod durch Erstickung führen können (HARTUNG & SEONG MOON, 1992; REICHEL, 1994; www.stbg.de). Akute Silikosen entwickeln sich rasch progredient nach sehr hoher Quarzstaubexposition (BANKS et al., 1983; BALAAN et al. 1993). Die Silikose ist Folge der bindegewebsbildenden und bindegewebslösenden Wirkung der freien kristallinen Kieselsäure (SiO_2). Sie kann auch als Folge der Einwirkung des Silikates Asbest (Asbestose) mit ähnlicher Wirkung auftreten. Quarzstaub zeichnet sich durch seine makrophagenzerstörende Wirkung (Zytotoxizität) und einen Lymphtropismus aus (WOITOWITZ IN: VALENTIN et al., 1985). Staubpartikel, die den Alveolarraum erreichen, werden von Alveolarmakrophagen phagozytiert, durch die physiologischen Reinigungsmechanismen in das Lungeninterstitium weitertransportiert und bevorzugt in den Lymphknoten deponiert (ROM et al., 1991; BECKLAKE, 1994). Phagozytierte Quarzpartikel aktivieren die Alveolarmakrophagen. Es kommt zu deren Proliferation und einer Alveolitis (= entzündliche Veränderung der Lungenbläschen) mit erhöhter Bildung von

Sauerstoffradikalen, die eine direkte Parenchymschädigung auslösen kann. Zusätzlich werden z. T. zelltoxische Zytokine (z. B. Fibronectin, Tumor-Nekrose-Faktor oder Insulin like growth factor) frei, welche die Fibroblastenproliferation und deren Kollagensynthese stimulieren (BEGIN 1987; ROM et al., 1987; GHIO et al., 1990; LAPP et al., 1993; BECKLAKE, 1994; VANHEE et al., 1995). Die Silikose kann auch nach Beendigung der gefährdenden Arbeit fortschreiten oder erst in Erscheinung treten (HESSEL et al., 1988; BALAAN et al., 1993; HNIZDO et al., 1993; BECKLAKE, 1994; FINKELSTEIN, 1994; REICHEL, 1994).

1.4 Experimentell nachgewiesene negative gesundheitliche Effekte von Zementstaub in der Lunge und den oberen Atemwegen

Zementstaub bewirkt in der Lunge negative gesundheitliche Effekte. Nach der intratrachealen Applikation von Zementstaub mit einem Gehalt an freiem Silica von 1,3 % können experimentell bei Ratten Pneumopathien (Lungenerkrankungen) ausgelöst werden. Es kann zur Bildung von Pseudopolypen um die kleinen Bronchien und Bronchiolen und im Endstadium zu einer Peribronchialen Fibrose kommen. Zusätzlich bilden sich perifokale und subpleurale Emphyseme im Bereich der betroffenen Bronchien (EINBRODT et al., 1966). Bei Ratten beobachtet man nach der Inhalation von Zementstaub eine Abnahme der elastischen Fasern in häufiger Begleitung eines fokalen Lungenemphysems (NIEPOLOMSKI et al., 1967). Bei einem Arbeiter, der 28 Jahre in einer Zementfabrik beschäftigt gewesen war, fand man bei der pathologischen Untersuchung seines Lungengewebes zahlreiche histiozytische Granulome, irreguläres, verhärtetes, fibrohyalines Narbengewebe mit vielen Einschlüssen von Zementstaub und bronchiektatische Läsionen (CORTEZ & PEIXOTO, 1978). Weiterhin belegen einige Untersuchungen von staubexponierten Arbeitern in Zementfabriken klinische Effekte wie Stenoseatmung, Kurzatmigkeit und Bronchialasthma, chronische Schleimbildung in der Lunge, Husten, Atemgeräusche, Sinusitis, chronische Rhinitis, Laryngitis und Pharynxkatarrh in Korrelationen mit der Dauer der Anstellung in der Fabrik und einer hohen, aktuellen Staubbelastung (KALACIC, 1973, 1974; OLERU, 1984; ABRONS et al., 1988; ALAKIJA et al., 1990; MACIEJEWSKA & BIELICHOWSKA-CYBULA, 1991; YANG, 1993; ABOU-TALEB et al., 1995; ALVEAR-GALINDO et al., 1999; NOOR et al., 2000; LARAQUI HOSSINI et al., 2002; BALLAL et al., 2004). RAFNSSON & JOHANNESDOTTIR fanden 1986 in einer retrospektiven Kohortenstudie in Island bei Maurern einen Hinweis darauf, dass die Exposition gegenüber

Zementstaub mit einer signifikant erhöhten Sterblichkeitsrate korrelierte. Insbesondere das Risiko an Tracheal-, Bronchial- oder Lungenkrebs zu erkranken, war anhand der statistischen Auswertung in dieser Berufsgruppe nachweislich gestiegen. Auch in Tierversuchen wurde beobachtet, dass Zementstaub atrophische und hypertrophische Veränderungen in der nasalen und pharyngealen Mukosa und eine exfoliative Bronchitis verursachen kann. In den Lungengeweben der Versuchstiere wurden leichte Gewebefibrosen und emphysemische Areale gefunden (MACIEJEWSKA & BIELICHOWSKA-CYBULA, 1991).

Generell wird das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken durch eine hohe, langjährige Staubbelastung und Zigarettenrauchen erhöht. Bei Rauchern ist das ziliäre Epithel geschädigt und der Abtransport von Partikeln verlangsamt. Das heißt, die Partikel verbleiben länger in den Atemwegen und wirken länger irritierend. Das Risiko einer chronischen Bronchitis und einer Reduktion der Lungenkapazität (Respiratorisches Volumen) steigt (BAZAS, 1980; CHEN, 2002).

In röntgenologischen Untersuchungen an Arbeitern aus der Zementindustrie zeigten sich Fälle von Silikose, Mikronodulationen und konfluente Veränderungen, welche meistens bei Arbeitern aus dem Steinbruch auftraten, die Kontakt mit den Rohmaterialien hatten (PARMEGGIANI, 1951; PROSPERI, 1957; ABRONS et al., 1997). Klinische und zytologische Untersuchungen von mukösen Nasalmembranen deuten auf einen Zusammenhang zwischen Zementablagerungen und entzündlichen Infiltrationen und atrophischen und hypertrophischen Veränderungen hin (JANICKA-BEUT & KORENKIEWICZ, 1997).

Auch die ventilatorische Lungenfunktion (FEV₁/FVC, VK, FVC₁, PEF) wird maßgeblich durch Zementstaub beeinflusst. Die Werte von belasteten Arbeitern aus der Zementindustrie sind signifikant niedriger als die aus Kontrollgruppen. Dabei ist es unerheblich, ob es sich um Raucher oder Nichtraucher handelt (KALACIC, 1973; 1974; OLERU, 1984; ALAKIJA et al., 1990; MENGESHA & BEKELE, 1997; ALI, 1998; AL-NEAIMI et al., 2001; NOOR et al., 2000; MWAISELAGE et al., 2004, 2006).

Bisher sind die negativen gesundheitlichen Effekte von Zementstaub bei Menschen auf den Nachweis von physiologischen Veränderungen der Lunge oder der Lungenfunktion beschränkt, der meistens durch Kohortenstudien, Lungenfunktionstests, röntgenologischen oder Gewebeuntersuchungen erbracht wurde.

Neben diesen nachgewiesenen negativen Effekten finden sich in der Literatur aber auch widersprüchliche Informationen über den Einfluss von Zementpartikeln auf die Gesundheit von Arbeitern in Zementfabriken. So weisen einige Arbeiten darauf hin, keine Effekte auf z.B. die Lungenfunktion von Arbeitern in Zementfabriken gefunden zu haben (VACCAREZZA, 1950; BAZAS et al., 1975; RASMUSSEN et al., 1977; MCDOWALL, 1986; VESTBO & RASMUSSEN, 1989, 1991; FELL et al., 2003). Die OSHA hat z.B. für Portland Zement, mit einem Anteil von weniger als 1 % Quarz, einen TLV-TWA von 10 mg/m³ festgelegt. Die bisherigen toxikologischen Daten zeigen angeblich keine Hinweise auf irreversible gesundheitliche Schäden bei einer hohen Zementstaubbelastung für 30 min (OSHA comments, 1989).

RIBEIRO fand 2006 keine Gentoxizität von Portlandzement in ovarialen Hamsterzellen im Comet-Assay.

Bei vielen weiteren Untersuchungen sind die Ergebnisse unklar, da das Studiendesign keine klare Abgrenzung der Effekte durch Zementstaub zu Einflüssen wie Tabak-, Alkoholkonsum der anderen Einflüssen oder Expositionen zulässt (OLSEN & SABROE, 1984; CAUVIN et al., 1990; BROWN et al., 1982; FLANDERS & ROTHMANN, 1982; FLANDERS et al., 1984; ZAGRANISKI et al., 1986; SZADKOWSKA & SZYMCZAK, 2001; STERN et al., 2001; KRSTEV et al., 1998; KELLER & HOWE, 1993).

1.5 Larynx-Karzinome

Eine häufige Folge von Staubpartikeln in den oberen Atemwegen kann ein sogenanntes Larynxkarzinom sein, worunter man ein bösartiges Geschwulst des Kehlkopfes versteht, welches je nach seiner Lage zur Stimmritze (Glottis) als glottisches Karzinom (im Bereich der Stimmritze, 60 % der Geschwülste), supraglottisches Karzinom (oberhalb der Stimmritze, etwa 30 %) oder subglottisches Karzinom (unterhalb der Stimmritze, sehr selten) bezeichnet wird. Erste Anzeichen sind oft eine anhaltende Heiserkeit, trockener Reizhusten, Schluckbeschwerden sowie Stimmveränderungen. Daneben können auch Räusperzwang oder ein Fremdkörpergefühl Hinweise auf ein Larynxkarzinom sein. In anderen Fällen können ins Ohr ausstrahlende Schmerzen, blutiger Auswurf und Atemnot erscheinen. Eine Diagnose wird durch eine laryngoskopische Untersuchung und einer Gewebeprobe (Biopsie) erstellt. Für Larynx-Karzinome werden hauptsächlich exogene Faktoren verantwortlich gemacht und dem

Entstehen des Kehlkopfkrebsses ein multifaktorielles Geschehen zugrunde gelegt. Als Hauptrisikofaktoren gelten primär der Tabakkonsum, aber auch Expositionen gegenüber beruflichen Schadstoffen (Stäube, insbesondere Asbest), Umweltfaktoren und Papillomavirus-(HPV)-Infektionen. Einen synergistischen Effekt beobachtet man durch den gleichzeitigen Konsum von Tabak und Alkohol, wodurch auch das Erkrankungsrisiko, insbesondere für supraglottische Karzinome, multiplikativ steigt (BRUGERE et al., 1986; DIETZ, 1995; CLOOS et al., 1996; SMITH et al., 1990; AHRENS et al., 1991; ZATONSKI et al., 1991; MAIER et al., 1990, 1994, 2002; BERGER et al., 1996). Jährlich erkranken in der Bundesrepublik Deutschland etwa 3.300 Männer und 500 Frauen, wobei am häufigsten Personen im Altersbereich von 50 – 70 Jahren betroffen sind. Je nach Art, Ort und Stadium des Tumors behandelt man den Kehlkopfkrebs mittels Operation, Bestrahlung, Chemotherapie oder einer Kombination aus den Behandlungsmethoden. In seltenen Fällen ist eine Kehlkopfentfernung (Laryngektomie) nötig (DIETZ, 2005).

Kehlkopfkrebs gehört zu denjenigen Tumorarten, die erfolgreich therapierbar sind. Die relativen Fünfjahresüberlebensraten werden für Männer vom Saarländischen Krebsregister mit 65.4 % angegeben sowie für Frauen mit 75.8 % (BECKER, 1998).

1.6 Toxizität von Partikeln allgemein

Feinstaub (PM₁₀ = Particulate Matter) bezeichnet die Masse aller im Gesamtstaub enthaltenen Partikel, deren aerodynamischer Durchmesser kleiner als 10 µm ist. Er kann natürlichen Ursprungs sein (beispielsweise als Folge von Bodenerosion) oder durch menschliches Handeln gebildet werden. Feinstaub entsteht aus Energieversorgungs- und Industrieanlagen, bei der Metall- und Stahlerzeugung oder auch beim Umschlagen von Schüttgütern. In Ballungsgebieten ist der Straßenverkehr die dominierende Staubquelle.

Der Tagesgrenzwert von Feinstaub beträgt 50 µg/m³ und darf nicht öfter als 35mal im Jahr überschritten werden. Der zulässige Jahresmittelwert liegt bei 40 µg/m³ (WWW.UMWELTBUNDESAMT.DE). Partikel, wie auch Zementstaub, nehmen unter allen toxischen Stoffen durch ihr einzigartiges physikochemisches Verhalten eine Sonderposition gegenüber chemischen Kanzerogenen ein. Eine große Rolle ihrer primären Toxizität und Pathogenität spielen vermutlich reaktive Sauerstoffspezies, in Abhängigkeit der Oberflächeneigenschaften (Methylierungseffizienz), Anwesenheit von Übergangsmetallen,

intrazellulärer Eisenmobilisation und der Lipidperoxidation. Dazu kommen die Größe der Partikel, wie auch die von Fasern, ihre Struktur, Kristallinität, Löslichkeit, Biopersistenz, Aufnahme der Partikel, ihre Interaktion mit der Zellteilungsmaschinerie und die Kopplung von Mutagenen an die Partikel (LINSEL, 2001). Das Markenzeichen ihrer sekundären Toxizität ist die starke und anhaltende Bildung von ROS (= reactive oxygen species; reaktive Sauerstoffspezies) aus inflammatorischen Zellen (SCHINS, 2002).

1.7 Aufnahme von Zementpartikeln über die Atemluft

Die Lunge bietet mit einer Angriffsfläche von ca. 100 bis 130 m² ein großes Ziel für Partikel in der Atemluft (etwa 50-mal mehr als die Oberfläche der Haut). Dennoch kann der menschliche Organismus sich vor der Aufnahme von vielen schädlichen Partikeln durch den Atemvorgang schützen, indem sie je nach Größe in verschiedenen Bereichen der Atemwege zurückgehalten werden. Ihr Schicksal hängt von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und ihrem interaktivem Verhalten mit dem Surfactant (s.u.) an der Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche der Alveolen ab. Bevor Partikel die immunkompetenten Zellen erreichen, müssen sie eine Barriere durchbrechen, die aus dem Surfactant, dem mukoziliären System, den phagozytierenden Atemwegsmakrophagen und dem Epithel mit seinen Tight Junctions besteht. Unlösliche Partikel, die in die Atemwege gelangen, werden weitestgehend durch die Aktivität des mukoziliären Systems entfernt. Bei dieser „Clearance“ werden die Partikel (< 5 µm) über die Tracheobronchial-Zilien direkt oder nach vorheriger Aufnahme nach oben befördert oder verschluckt. Im Bereich unter dem Surfactant, werden sie von Surfactant oder dessen Komponenten im Interstitium ummantelt. Diese Deponierung und Umhüllung der Partikel kann eine Halbwertszeit von einem Jahr haben. Während dem Transport der Partikel durch das oder auf dem Lungenepithel kommen sie mit den phagozytierenden Atemwegsmakrophagen in Kontakt. (GEH et al., 2005). Bei ultrafeinen Partikeln ist die alveoläre „Clearance“ allerdings weniger effektiv (OBERDÖRSTER et al., 1994).

Für die effizienteste, primäre Immunantwort in der Lunge sind die Dendritischen Zellen verantwortlich. Sie haben eine sternförmige Gestalt mit Armfortsätzen, die ins umliegende Gewebe ragen und aktiv bewegt werden können. Sie können ruhende sowie native T-Zellen aktivieren, wobei eine kleine Anzahl von Zellen ausreicht, um große Mengen T-Helfer- und

zytotoxische Effektor-T-Killerzellen zu aktivieren. Sie liegen zunächst im unreifen Zustand in der Lunge vor und nehmen Antigene aus dem Gewebe auf. *In vitro* Studien zeigen, dass sie dafür in der Lage sind, Tight Junctions zwischen den Epithelzellen zu öffnen und dendritische Fortsätze auszusenden, um z.B. direkt Bakterien aufzunehmen (RESCIGNO et al., 2001). Ihre Reifung wird von Makrophagen unterdrückt. Erst wenn ein immunologischer Stimulus die Suppression überwindet, wird die weitere Reifung veranlasst, bis eine Immunantwort erfolgt (HÖHNE, 2006).

Die Dendritischen Zellen (DC) bilden auf der Oberfläche des Epithels der Atemwege eines Erwachsenen ein Netzwerk mit einer Dichte von ca. 400-800 DC/mm². Sie liegen im lockeren Gewebe um die Gefäße und in der Pleura. Die meisten von ihnen findet man in der Bronchialmukosa, oberhalb oder unterhalb der Basalmembran oder tief im Inneren der Lamina propria, wo sich die Abwehrreaktionen der Atemwege abspielen. Um dorthin zu gelangen müssen die Partikel durch das Epithel wandern oder zwischen den Zellen hindurch (durch die Tight Junctions).

Partikel werden je nach Größe in verschiedene Fraktionen unterteilt, entsprechend dem Bereich, in den sie vordringen können. So besteht die einatembare Staubfraktion aus Partikeln mit einer Größe, die potenziell in den Respirationstrakt eindringen können. Die alveolengängige Fraktion besteht aus Partikeln, die potenziell den Bereich der Gasaustauschregion der Lunge erreichen können. Dabei können Teilchen, die im Durchmesser größer sind als 8 µm, bereits in der Nase aus der Atemluft ausgefiltert werden. Kleinere Teilchen gelangen in den thorakalen Bereich und nur Teilchen unter 2,5 µm erreichen die Alveolen (PM_{2,5}). Der Durchmesser einer menschlichen Alveole beträgt etwa 200 bis 300 µm. Ihre Oberfläche ist mit zwei verschiedenen Zelltypen bedeckt, den Alveolarzellen Typ I und Typ II (Pneumozyten). Die Alveolarzellen Typ I sind sehr dünn und weisen eine glatte Oberfläche auf. Sie bedecken ungefähr 90% der Oberfläche und sind gegenüber direkt wirkenden toxischen Stoffen sensitiver als Clarazellen (produzieren Surfactant) oder Typ II Zellen. Die Alveolarzellen Typ II haben eine kuboide Form und bedecken etwa 10 % der alveolären Oberfläche. Sie enthalten granuläre Einschlüsse, welche das Surfactant sezernieren. Dieses bildet einen dünnen Film auf den Alveolenwänden und reduziert die Oberflächenspannung beträchtlich, wodurch es einen hohen Stellenwert bei der Lungenmechanik einnimmt (LINSEL, 2001; MARQUARDT, 2004).

Teilchen, die 4 – 1 µm groß sind, bleiben auf dem Lungengewebe liegen, d.h. sie gelangen nicht ins Zellinnere. Teilchen mit einer Größe unter 80 nm (Ultrafeine Partikel = < 100 nm)

gelangen durch Diffusion in das Zellinnere. Dabei müssen die Surfactant-Schicht, das alveoläre Epithel, die Basalmembran und das vaskuläre Endothel überwunden werden. Der Durchmesser dieser Schichten beträgt etwa 0,4 bis 2,5 μm . Partikel, die größer als 1 μm sind, können im bronchialen Bereich durch den mukoziliären Apparat aus dem Atemtrakt befördert werden, in den Alveolen durch die Alveolarmakrophagen. Durch die in den Alveolen frei beweglichen Makrophagen können aber auch biopersistente Partikel in das Gewebe aufgenommen werden und dort zur Wirkung kommen.

Die Partikelgrößenbereiche mit der potentiell höchsten Lungengefährlichkeit vom Standpunkt der Lungengängigkeit aus betrachtet, liegen für Bioaerosole zwischen 1 – 2 μm und unterhalb von 50 nm ($\text{MMAD} < 5 \text{ micrometer} = \text{Mass median Aerodynamic Diameter}$).

Die Partikelgröße von Zement liegt zwischen 0,01 – 200 μm (0,05 – 20 μm , OLERU, 1984), wobei die durchschnittliche Größe bei 1 – 50 μm liegt. Der Anteil von Partikeln, die kleiner sind als 8 μm , wird auf 30 – 50 % geschätzt. Somit ist der ganze Respirationstrakt Zielorgan für Zementpartikel.

Die Konzentration an Zementstaub ist in verschiedenen Teilen einer Zementfabrik unterschiedlich. Gerade in Entwicklungsländern sind die Sicherheitsvorkehrungen mangelhaft, um das meist auch noch ungeschulte Personal vor der Staubbelastung zu schützen. So wurden in einer indischen Zementfabrik totale Staubbelastungen von bis zu 1,24 mg/m^3 gemessen (YANG, 1993; NOOR, 2000). Die größte Gefahr für Arbeiter Zementstaub über die Lunge aufzunehmen, entsteht bei der Gewinnung der Rohmaterialien im Steinbruch, der Mühle, den Drehöfen und für die Kranführer an Lagerplätzen und Abfüllanlagen. Dort sind die Belastungen nach gravimetrischen Staubgehaltbestimmungen höher als in der Verpackung, dem Brennofen oder der Zementmühle und höher als der Grenzwert von 20 mg/m^3 Gesamtstaub. Luftübertragene Partikelkonzentrationen von 5 bis zu über 40 mg/m^3 konnten an solchen Arbeitsplätzen in der Zementindustrie gemessen werden (FAIRHURST et al., 2005). Staub-Messungen seit Mitte der 70er Jahre liegen meist unter 10 mg/m^3 , in Ausnahmen über 25 mg/m^3 . Die einatembare Staubfraktion liegt generell unter 0,2 mg/m^3 (JAKOBSSON et al., 1990).

Aber nicht nur für Arbeiter, die direkt in Kontakt mit Zementstaub an ihrer Arbeitsstelle kommen, stellt Zementstaub eine mögliche Gefahr dar, sondern auch für Anwohner in der Nähe von Zementfabriken. Dies ist an europäischen Standorten seltener der Fall, trifft aber für Standorte vor allem in Nahostgebieten zu. Diese Staubbelastung ist nicht zu vernachlässigen,

da in der Umgebung einer iranischen Zementfabrik Feinstäube wie PM 10, PM 2,5, PM 1,0 in einer Reichweite von 590 – 1370 m messbar waren (BAROUTIAN et al., 2006).

1.8 Comet Assay (Einzelzell-Gel-Elektrophorese, SCGE)

Das menschliche Genom ist empfindlich gegenüber Einwirkungen verschiedenster chemischer Substanzen und physikalischer Einflüsse aus der Umwelt. Die DNA kann durch sie beschädigt werden. Obwohl der größte Anteil solcher DNA-Läsionen vom Organismus vollständig repariert werden kann, besteht die Gefahr des Überganges dieser Schäden in eine bleibende, erbliche Mutation. Alkylierende Substanzen und reaktive Sauerstoffspezies können z.B. DNA Einzelstrangbrüche oder alkalilabile Stellen induzieren (SPEIT & DENNOG, 2000). Der Comet Assay wurde entwickelt, um solche DNA-Brüche und die Reparaturmechanismen in isolierten Zellen nachzuweisen und qualitativ sowie quantitativ zu erfassen (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000). In dem Assay werden aus einer Einzelzellsuspension Zellen in Agarose aufgenommen und auf Objektträger aufgetragen. Durch einen Lyseprozess werden die Zellmembranen und Proteine zerstört. Anschließend wird eine Alkalidenaturierung der Nukleinsäuren durchgeführt, um Einzel- und Doppelstrangbrüche oder alkalilabile Stellen detektieren zu können. Wird die DNA anschließend durch Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 13$) in ein elektrisches Feld gebracht, bewegt sich die DNA in Abhängigkeit ihrer Länge vom negativen zum positiven Pol hin.

Für die mikroskopische Auswertung werden die Präparate mit einem DNA-bindenden Farbstoff (z.B. Ethidiumbromid oder 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid = DAPI) angefärbt. Erscheinen die Zellen rund und unversehrt, so gelten sie als Zellen ohne nachweisbare DNA-Schäden. Wurden DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche induziert, kommt es zu einer erhöhten Migration von chromosomaler DNA aus dem Kernbereich in Richtung der Anode. Dadurch hebt sich die Zelle in gefärbtem Zustand wie ein Komet mit Schweif von den übrigen Zellen ab (Abb. 1) (MARQUARDT & SCHÄFER, 2004).

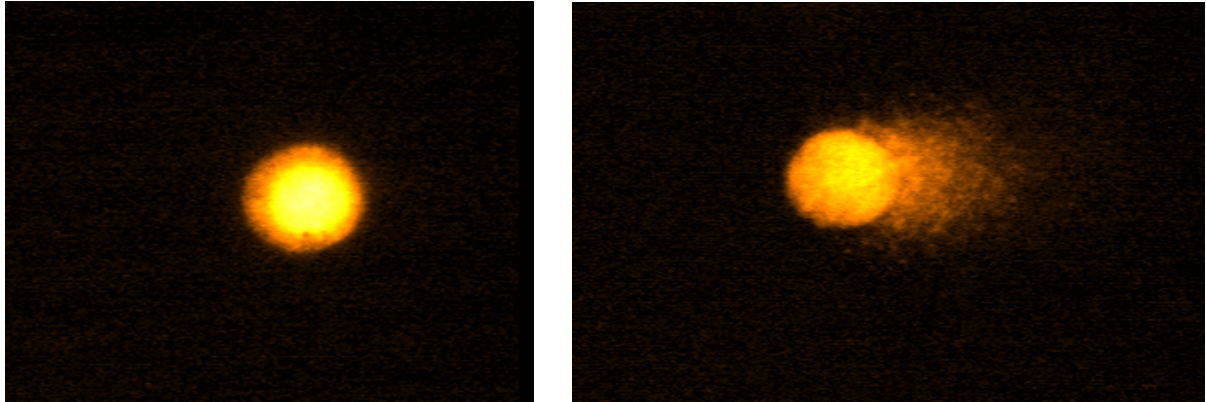


Abb.1: Mit Ethidiumbromid angefärbte primäre Epithelzellen nach Durchführung des Comet Assays.
Links: Zelle ohne erkennbare DNA-Schäden, Rechts: Zelle mit starker DNA-Migration (Kometenschweif)

Normale zytotoxische Prozesse wie der programmierte Zelltod (Apoptose) oder durch zytotoxische Substanzen verursachte DNA-Migration, die nicht durch eine Interaktion der Testsubstanz mit der DNA verursacht wird, lassen sich bei der Interpretation der Testergebnisse nur schwer abgrenzen, und dem möglichen Auftreten falsch positiver Ergebnisse ist eine hohe Aufmerksamkeit zu widmen. Generell muss Zytotoxizität durch Tests in bezug auf die Zellvitalität ausgeschlossen werden (ELIA, 1994).

Die Bildung des „Kometenschweifes“ wird zum einen durch DNA in Form von gelockerten Schleifen verursacht. Diese Schleifen entstehen durch Einzelstrangbrüche, die zu einer teilweisen Entspiralisierung der DNA führen, welche sich nur wenig vom „Kometenkopf“ entfernt. Sie können durch Lyse und Elektrophorese unter neutralen Bedingungen detektiert werden (ÖSTLING & JOHANSON, 1984; KLAUDE et al., 1996). Die Bruchstellen in der DNA sind hier weit voneinander entfernt und liegen nur teilweise als Einzelstrang vor. Sie wandern im elektrischen Feld viel langsamer, da sie groß sind, gegabelt und noch mit DNA im „Kopf“ des Kometen verbunden sein können. Einzelne Fragmente, die aus Doppelstrangbrüchen entstehen, können als DNA-Schleifen eine weitere Strecke im elektrischen Feld zurücklegen, was zu einem längeren „Kometenschweif“ führt. Solche freien Bruchstücke entstehen aus Bruchstellen, die nach der Durchführung des Comet Assays unter alkalischen Bedingungen im DNA-Strang nahe beieinander liegen. Die DNA kann in solchen Bereichen der Doppelhelix völlig entspiralisiert werden und die Bruchstücke werden frei (KLAUDE et al., 1996).

Der Comet-Assay hat durch seine Sensitivität (geringe Zellzahl nötig), Vielfältigkeit (*in-vitro* und *in-vivo* einsetzbar), geringen Kosten, einfache und schnelle Handhabung in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, um schnell Informationen über das Ausmaß und die Art (Doppel-, Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und Quervernetzungen) von DNA-Brüchen und deren Reparaturkapazität zu erhalten (FAIRBAIRN et al., 1995; COLLINS et al., 1997; RAJAEI-BEHBAHANI, 2001; SCHMEZER, 2001) und wurde deshalb für die vorliegende Untersuchung als geeignete Methode ausgewählt.

2. Fragestellung

Vor dem Hintergrund der Untersuchungsergebnisse der Rhein-Neckar-Studie (BECHER & DIETZ et al., 2002), die auf einen Zusammenhang von Krebserkrankungen im Larynx-Pharynx Bereich und der Exposition mit Zementstaub hinweisen, soll in dieser Mutagenitätsstudie anhand von toxikologischen Modellen festgestellt werden, ob ein erkennbarer Unterschied zwischen Biopsieproben von bereits an einem Larynxkarzinom erkrankten Probanden und von nicht erkrankten Probanden hinsichtlich der individuellen Suszeptibilität gegenüber Zementpartikeln besteht. Abzuschätzen ist, ob das Risiko, durch eingeatmete Zementpartikel an Krebs zu erkranken, unabhängig von Tabak- und Alkoholkonsum und dem individuellen Lebensstandard bei prädisponierten Personen höher ist als bei anderen Personen.

Es sollen mögliche Zusammenhänge zwischen einer Zementpartikel-induzierten DNA-Schädigung und der Entstehung von Larynx-Pharynx-Karzinomen in humanen *ex vivo*-Zellsystemen (primäre Oropharyngeal Mukosazellen) evaluiert werden.

Hierzu wurden die unten aufgeführten zellbiologischen und molekularbiologischen Methoden an primären Zellen im Zeitraum zwischen dem 24.5.2007 und dem 31.12.2007 eingesetzt:

1. Comet Assay (Einzelzell-Gel-Elektrophorese) als Nachweisverfahren für DNA-Strangbrüche und oxidative DNA-Schäden.
2. Zellvitalitätstest mit dem Erythrosin B -Test.

Die so ermittelten Ergebnisse werden mit einem statistischen Analyseverfahren (Student's T-test) bewertet, verglichen und graphisch als „Boxplots“ dargestellt.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Hersteller

Tab.3: Verwendete Chemikalien und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
0,5% Low Melting Point Agarose	Serva, Heidelberg
0,7% Normal Melting Point Agarose	Merck, Darmstadt
1% Normal Melting Point Agarose	Serva, Heidelberg
Aceton	Merck, Darmstadt
Benzo(a)pyren	Sigma-Aldrich, München
Bovine Pituitary Extract Protein Conc. 12,4 mg/ml	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe Corporation
4,6-Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Darmstadt
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, low glucose)	PAA, Pasching
Dörentuper Quarz	IUFZ, Düsseldorf
Dulbeccos PBS (1×)	PAA, Pasching
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Roth, Karlsruhe
EGF Human Recombinant Protein Conc. 0,43 µg/µl	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe Corporation
Erythrosin B	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid, 1%	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälber Serum (FKS)	PAA, Pasching
HCL (Salzsäure) rauchend 37 %	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma, München
Keratinocyte-SFM Medium (Kit)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe Corporation
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching
Supplements For Keratinocyte – SFM	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe Corporation
Titandioxid (Anatase)	IUFZ, Düsseldorf
Tris Puffer	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	PAA, Pasching
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂ , Perhydrol)	Merck, Darmstadt
Zement H1 und G	VDZ Deutsche Zementindustrie

Besondere Geräte und Materialien	Hersteller
Bildanalysesystem	Optilas, Dietzenbach
Comet Analysesoftware 3.1	Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, GB
Electronicrührer	Thermo Fisher Scientific,
Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresekammer	Biostep, Jahnsdorf
Falcon Tube 10 und 50 ml	Greiner, Fracht
Feinwaage	OHAUS, Pine Brook (US)

Fluoreszenzmikroskop DMLS	Leica, Solms
Heizofen	Memmert, Schwabach
Inkubator	WTC Binder, Tuttlingen
Laser Partikelanalysator	Cilas US corp., Wisconsin (US)
Laminar Flow Bench	Kendro Laboratory Products
Lichtmikroskop	Leica, Solms
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Objektträger, ganz mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
pH-Meter	inoLab (WTW), Weilheim
Quecksilber-UV Lampe, 254 nm, 50W/AC	Osram, München
Standröhrchen	Greiner, Flacht
Transwells	Greiner, Flacht
Ultraschall-Kompaktgerät	Roth, Karlsruhe
Vakuum-Saugpumpe	HLC, Bovenden
Vortexer	IKA, Staufen
Waage	SCALTEC, Göttingen
Wasserbad	Medingen
Zellkultur(Gewebe-)Schale, 12 Well	Greiner, Flacht
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

3.1.1 Lösungen

Agaroselösungen für Objektträgerbeschichtung

1. Schicht:	1 % Normal Melting Point Agarose Auf 50 ml PBS	0,5 g
2. Schicht:	0,7 % Normal Melting Point Agarose Auf 20 ml PBS	0,14 g
3. Schicht:	0,5 % Low Melting Point Agarose Auf 20 ml PBS	0,1 g

Sonstige Lösungen

Benzo(a)pyren	Stammlösung = 10 mM, Lösung in sterilem DMSO
DAPI	Stammlösung = 20 µg/ml PBS Arbeitslösung = 0,2 µg/ml PBS
DMEM-Medium	DMEM, FCS (10 %), Hepes (1 M), Penicillin/Streptomycin (1 %)

Ethidiumbromid	Stammlösung = 100 µL 1% EB-Lösung auf 50 ml Aqua dest. Arbeitslösung = 1: 10 Verdünnung	
Erythrosin B	1 mg/ml PBS	
Lysestammlösung	NaCl (2,5 M) EDTA-Titriplex (100 mM) NaOH (0,2 M) Auf 1 L Aqua dest. pH = 10 Triton-X-100 (1 %) auf 200 ml Lysestammlösung (vor Gebrauch)	146,1 g 37,224 g 8 g 2 ml
Elektrophoresepuffer	NaOH (0,3 M) EDTA-Titriplex (1 mM) Auf 1 L Aqua dest. pH > 13	12 g 10 ml
Neutralisationspuffer	0,4 M Tris Auf 1 L Aqua dest. pH = 7,5 (einstellen mit ca. 25 ml HCL)	48,44 g

3.1.2 Primäre Epithelzellen

Für diese Untersuchung an Zementpartikeln wurden primäre Mukosaepithelzellen aus dem oberen Atemtrakt (Larynx-Pharynx) ausgewählt, da diese beim Einatmen von Staub als erstes mit diesem Fremdstoff in Kontakt kommen.

Hierfür wurden Zellproben von insgesamt 55 Patienten untersucht. Von diesen Proben stammten 31 von gesunden Patienten, bei welchen die Zellproben (primäre Mukosazellen) während einer Tonsillektomie entnommen wurden, und 24 von Patienten, die an einem Pharynx-Larynx-Karzinom erkrankt waren und die Zellproben von gesundem, dem Tumor nahe liegendem Gewebe, während der Entfernung des Tumors, entnommen wurden. Nach der Entnahme wurden die makroskopisch gesunden Zellproben im HNO-Forschungslabor des Leipziger Instituts für Pathologie für 2-3 Wochen weiter kultiviert, um eine ausreichende Menge an Zellmaterial zu gewinnen (Abb. 2).

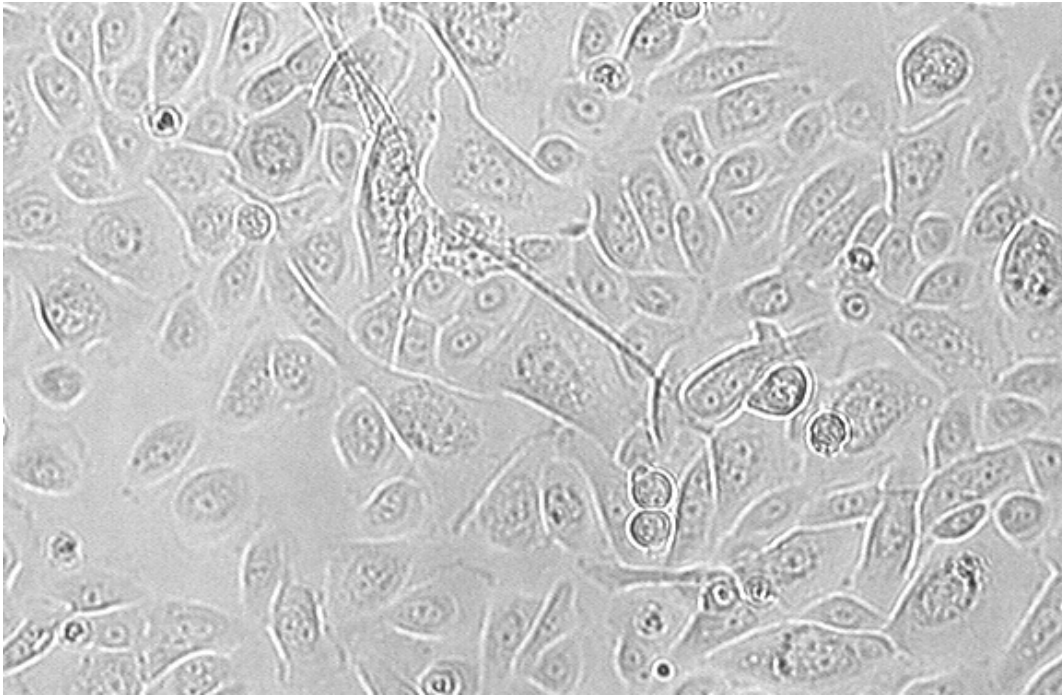


Abb.2: Primäre oropharyngeale Mukosaepithelzellen nach 4 h in KSF-Medium. Die Zellen sind konfluent und unversehrt.

Die Biopsieproben wurden dann als Pellet in einem 14 ml Polystyrol Falcon Tube (überevull mit KFS-Medium gefüllt) versendet, mit 1% Zusatz an BSA (Bovines Serumalbumin). Die Pakete wurden mit dem Lieferservice TNT über Nacht versendet und waren stets 24 h unterwegs. Gekühlt wurden die Zellproben mit einem oder zwei Kühlakkus. Nach dem Eintreffen in Giessen wurde nach dem Zentrifugieren bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten, Verwerfen des Überstandes bis auf einen Rest von 5 ml und erneutem Resuspendieren der Zellen in den verbliebenen 5 ml KSF-Medium, anhand des Erythrosin B Testes die Zellvitalität bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in 12er Wells mit einer Dichte von ca. 200 000 Zellen pro 3,801 cm² mit 2 ml Keratinocyte-SFM (Serumfreemedium) Medium eingesät und bei 37°C, 5% CO₂ -Atmosphäre und 95% Luftfeuchte inkubiert.

Um eine optimale Adhärenz der Zellen auf dem Boden der Wells zu gewährleisten und Transportstress als schädigenden Effekt für den Versuch auszuschließen, wurde mit dem Versuchsbeginn erst 48 Stunden nach der Aussaat und einem Mediumwechsel am zweiten Tag begonnen. Alle Proben gingen dadurch in etwa gleich guter Kondition in den Versuch (Vitalität über 70 %). Sämtliche 55 Biopsieproben wurden nach der Ankunft in Giessen auf die Zellvitalität und im Comet Assay auf Gentoxizität und Zytotoxizität hin untersucht.

3.1.3 Zemente

Für die Untersuchung der Biopsieproben wurden zwei Zemente in der Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf den Zellen getestet. Eine Testung von verschiedenen Konzentrationen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve war aufgrund der geringen Zellzahl der Primärzellen nicht möglich. Die Zemente wurden als Blindproben vom VDZ Deutsche Zementindustrie gesendet und in der Untersuchung als H1 und G bezeichnet. Die Auswahl geschah aus einer Produktpalette von 11 verschiedenen Zementen, die in einer Vorstudie in Giessen auf Auffälligkeiten bezüglich der Geno- und Zytotoxizität im Comet Assay und im Mikrokerntest mit A549 Zellen getestet worden waren (GMINSKI ET AL., in Vorbereitung). Auffällig zeigten sich die Zemente H1 und G lediglich bei der Analyse der Feinfraktion ($<10\ \mu\text{m}$) (Abb. 3). Der Zement H1 hat einen verhältnismäßig höheren Anteil an Kobalt, Chrom, Mangan, Nickel, Vanadium, Zink, Phosphor(V)-oxid und Calciumoxid als vergleichbare Produkte. Zudem handelt es sich hierbei um einen reinen Portlandzement und ist deshalb repräsentativ für nahezu alle Zemente, da der größte Anteil ihrer Zusammensetzung aus Portlandzement besteht. Zement G enthält verhältnismäßig mehr Mangan, Zink, Chrom, Vanadium, Silizium(IV)-oxid, Aluminiumoxid, Eisen(III)-oxid und Mangan(III)-oxid (Tab.4). Er besteht zu ca. 80% aus Portlandzement und enthält einige puzzolanische Anteile.

Tab.4: Spurenmetalle in der Feinfraktion der Zemente H1 und G.

	Zement H1 in $\mu\text{g}/\text{g}$	Zement G in $\mu\text{g}/\text{g}$
Chrom	429	227
Mangan	456	1144
Nickel	211	107
Vanadium	192	136
Zink	714	426

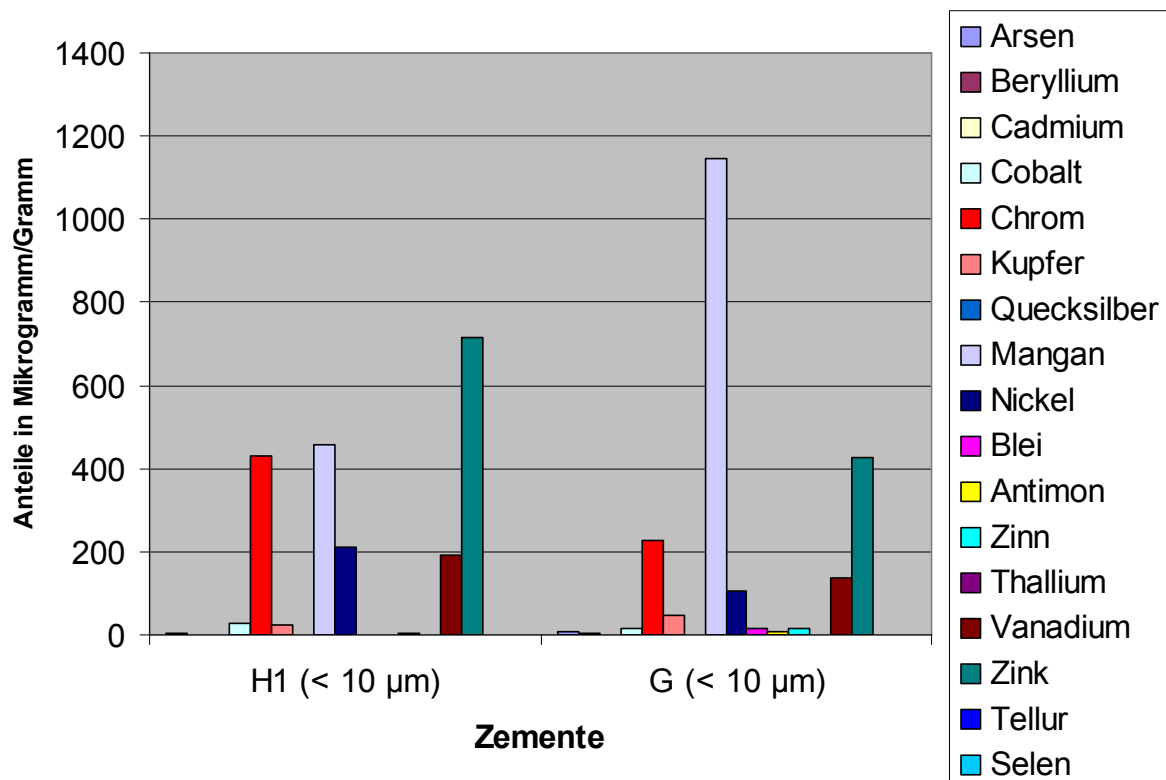


Abb.3: Konzentrationen an Spurenmetallen in µg/g in den Feinfraktionen (< 10 µm) der untersuchten Zemente H1 und G (VDZ Deutsche Zementindustrie)

Ein weiteres Auswahlkriterium für Zement G war sein gentoxischer Effekt in der höchsten getesteten Konzentration (200 µg/cm²) (GMINSKI ET AL., in Vorbereitung).

3.1.4 Kontrollen

Als Positivkontrolle zur Bestätigung, dass die Zellproben auf Partikel mit verstärkter DNA-Migration reagieren können, wurde Dörentruer Quarz (DQ12) in einer Konzentration von 100 µg/cm² verwendet (Abb. 4). Die Quarzproben wurden freundlicherweise vom IUF Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Quarz zählt seit 1997 zu den Karzinogenen Gruppe 1 der IARC und schädigt die DNA (DNA-Strangbrüche) in Ratten- (RLE) und menschlichen Alveolarzellen (A549). Dieser Effekt wird von den Hydroxylradikale erzeugenden Eigenschaften der Quarzpartikel gesteuert (PARK et al., 1992; SCHINS et al., 2002).



Abb.4: Primäre Epithelzellen nach 4 h Belastung mit Quarzpartikeln.

Um ein weiteres Kontrollsystem zu haben, wurde zusätzlich als Positivkontrolle das ubiquitär vorkommende Promutagen Benzo(a)pyren in einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/l}$ verwendet. Dieser fünf-Ring PAK ist von der IARC als wahrscheinliches Humankarzinogen (A2) klassifiziert.

Als Negativkontrolle wurde Titandioxid (TiO_2 , Anatase) vom IUF Düsseldorf verwendet, da es als biologisch inerte, nicht pathogene Substanz in Tieren und Menschen gilt (Abb. 5). Es kommt an staubigen Arbeitsplätzen vor, wie bei der Bearbeitung von Rutil (BERNARD et al., 1990; CHEN & FAYERWEATHER, 1988; HART & HESTERBERG, 1998; LINDENSCHMIDT et al., 1990; OPHUS et al., 1979). So sollte für jede Zellprobe gezeigt werden, dass die Zellen auf inerte Partikel in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/cm}^2$ nicht mit verstärkter DNA-Migration reagieren.

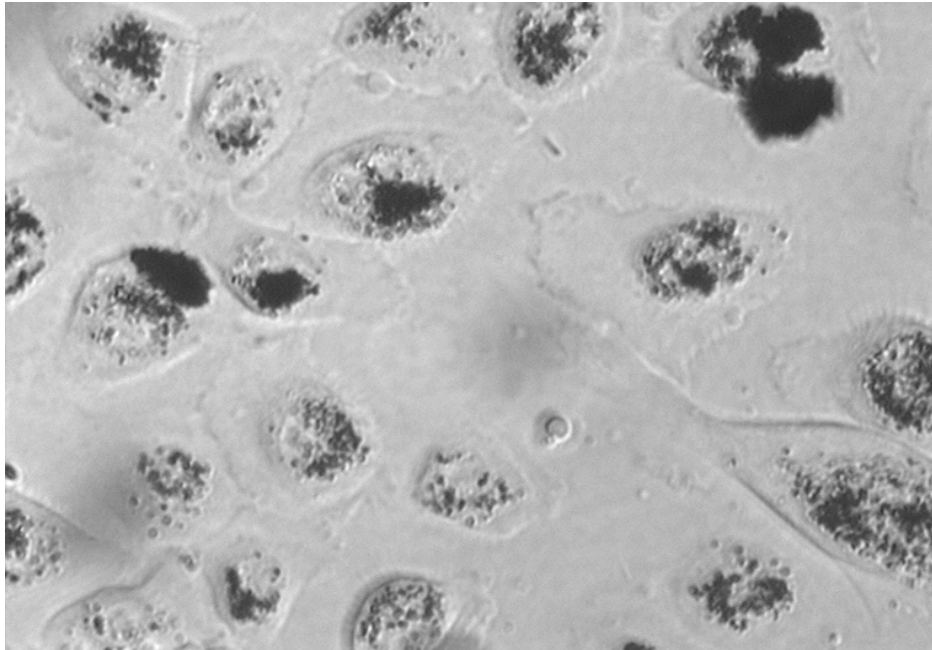


Abb.5: Primäre Epithelzellen nach 4 h Exposition mit TiO_2 . Die Partikel liegen konzentriert auf den Zellen.

Die folgende Tabelle 5 zeigt Größe, spezifische Oberfläche und Siliziumgehalt der Zemente, sowie der Kontrollsubstanzen TiO_2 und Quarz. Die D50-Werte geben die Größe des Hauptanteils der Partikel an, das heißt es sind keine Partikel enthalten, die größer sind als der obere D50-Wert, aber dennoch ein großer Anteil an wesentlich kleineren Partikeln als der untere D50 Wert (Ultrafeinpartikel, $< 10 \mu\text{m}$). Die verwendeten Zementstaubfraktionen wurden durch Zick-Zack-Sichtung und mit Hilfe von Laser Partikelanalyse (CILAS 1064) im VDZ untersucht. Die Größenauswahl der Partikel durch einen Alpin ZZAir classifier zielte auf eine Durchschnittsgröße der Partikel von $1 - 3 \mu\text{m}$ ab.

Tab.5: Oberflächenangaben und SiO_2 -Gehalte der Zemente und Kontrollen

Proben	Größe D50 in μm	Spezifische Oberfläche (cm^2/cm^3)	SiO_2 (% w/w)
Zement H1 (CEM I)	1 – 1,5	63688	16,26
Zement G (CEM II/B-P)	1,5 – 2,0	86892	29,92
Quarz	1,0 – 2,0	-	> 90
TiO_2	0,2 – 0,5	-	

3.2 Zytotoxizität

Mit dem Erythrosin B-Test wurde die Vitalität der primären Epithelzellen direkt nach Eintreffen der Zellen in Giessen getestet und ebenso nach vierstündiger Belastung der Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen, um Zytotoxizität als Ursache für die gemessene DNA-Migration ausschließen zu können. Hierfür wurden die Zellen nach der Exposition zweimal mit PBS gewaschen, um sie gründlich von den Zementpartikeln zu befreien. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen durch Trypsinieren mit 1 ml Trypsin für 5 min bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 95% Luftfeuchte aus den Wells gelöst und die Reaktion mit serumhaltigem DMEM-Medium abgestoppt (FCS-haltig). Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit der Pipette aus den Wells gewaschen, die Zellvitalität bestimmt und für die Elektrophorese aufgearbeitet.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde je ein Aliquot von 50 µl Zellsuspension aus den Wells mit 50 µl Erythrosin B gefärbt und nach 5 min Reaktionszeit in der Zählkammer mit Netzeinteilung nach Neubauer ausgezählt.

Zur Berechnung wurde die Anzahl der gezählten Erythrosin B-negativen Zellen (= lebende Zellen, ungefärbt) durch die Anzahl der insgesamt gezählten Zellen (Erythrosin B-negative Zellen und Erythrosin B-positive Zellen) dividiert (Erythrosin B-positive Zellen = tote Zellen, rot gefärbt). Das Ergebnis ist die Zellvitalität in Prozent (= % lebende Zellen).

$\frac{\text{Erythrosin B-negative Zellen}}{\text{Erythrosin B-negative Zellen} + \text{Erythrosin B-positive Zellen}} = \text{Zellvitalität in \%}$
--

3.3 Einzelzell-Gel-Elektrophorese

8 – 10 mg der Zemente, Quarz und Titandioxid wurden einen Tag vor dem Versuch bei 215°C für 6 h im Ofen hitzedeaktiviert, um einer eventuellen Kontamination mit Endosporen aus der Raumluft vorzubeugen. Vor dem Aufbringen auf die Zellen wurden die so vorbereiteten Stäube in KSF-Medium für 15 Minuten im Ultraschallbad (37 °C, 120W/50&60Hz) suspendiert.

Die untersuchten Zemente H1 und G wurden in den Konzentrationen 200 µg/cm² auf die Zellen aufgetragen. Dies ist die Dosis, bei welcher gentoxische Effekte erwartet werden und die noch gut als Suspension auf die Zellen aufgetragen werden kann. Bei höheren Konzentrationen lägen die Zementpartikel übereinander und eine gleichmäßige Verteilung der Partikel auf den Zellen wäre nicht mehr zu garantieren. Für Quarz wurde nach der Ermittlung der entsprechenden Dosis-Wirkungskurven die Konzentration 100 µg/cm² gewählt und für Titandioxid 200 µg/cm² sowie für Benz[o]apyren 200 µmol/l (VOJNAR & STECHER, 2007; NOAK & WEIGL, 2007). Eine Übersicht über Testsubstanzen und Konzentrationen findet sich in Tabelle 5.

Tab.6: Anzahl der Testsubstanzen und Konzentrationen

	Testsubstanzen	Konzentrationen
1	Medium	
2	Zement H1	200 µg/cm ²
3	Zement G	200 µg/cm ²
4	Quarz	100 µg/cm ²
5	TiO ₂	200 µg/cm ²
6	Benzo[a]pyren	200 µmol/L

Die Zellen wurden für 4 Stunden mit den in der Tabelle 5 angegebenen Stoffen inkubiert (37°C, 5% CO₂, 95% rel. Luftf.).

Danach wurde wie unter Kapitel 3.2 beschrieben die Zellvitalität bestimmt. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 1200 rpm und 4° C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 100 µl 0,5% *Low Melting Point Agarose* resuspendiert und auf die mit zwei Schichten vorbereiteten Objektträger gegeben. Die angerauten Objektträger wurden vor der Präparation in einem 1:1 Aceton/Ethanolgemisch für 5 Minuten gereinigt. Die erste Schicht bestand dann aus 1% *Normal Melting Point Agarose* (Objektträger eingetaucht) und die zweite Schicht aus 100 µl 0,7% *Normal Melting Point Agarose*, die 20 Minuten vor Gebrauch bei 4°C auf den Objektträgern erhärten konnte. Nach Auftragen der Zellen und Abdecken mit einem Deckgläschen wurden die Objektträger erneut für 20 Minuten bei 4°C gelagert, um eine ausreichende Festigkeit der Agarose zu erzielen. Nach Entfernen des Deckgläschens wurden die Objektträger in Lyselösung (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA-Titriplex, 0,2 M NaOH,

1% Triton X-100, pH 10) bei 4°C bis zum nächsten Tag aufbewahrt, um die Entfaltung der DNA zu ermöglichen. Am darauf folgenden Tag wurden die Objektträger in einer Horizontalgelelektrophorese platziert und lagen zunächst für 20 Minuten im eingefüllten Elektrophoresepuffer (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA-Titriplex, pH > 13), um die Trennung der DNA-Stränge voneinander zu gewährleisten. Die Elektrophorese wurde anschließend bei 25 V und 300 mA für 25 Minuten bei 4°C durchgeführt. Ihr folgte die Neutralisation für 10 Minuten in 0,4 M Trispuffer. Nach gründlichem Spülen mit Aqua dest. waren die Objektträger fertig für die Auswertung innerhalb der nächsten Tage.

Die computergestützte Auswertung wurde mit einem Bildanalysesystem der Firma Optilas mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes und einer damit verbundenen CCD-Kamera bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm durchgeführt. Einzelbilder von einzelnen Zellen wurden bei 400facher Vergrößerung digital aufgenommen. Für die Auswertung wurden die Objektträger mit 50 µl Ethidiumbromid gefärbt. Es wurden insgesamt drei Objektträger gefärbt und von diesen jeweils 101 Zellen vermessen. Um das Ausmaß an DNA-Schäden anzugeben, wurde der Olive Tail Moment gewählt. Die mit TiO₂ belasteten Objektträger konnten aufgrund der starken Eigenfluoreszenz von TiO₂ nicht mit Ethidiumbromid zur Comet-Analyse gefärbt werden. Die Zellen waren zu sehr überlagert von stark fluoreszierenden TiO₂ Partikeln (Abb. 6).

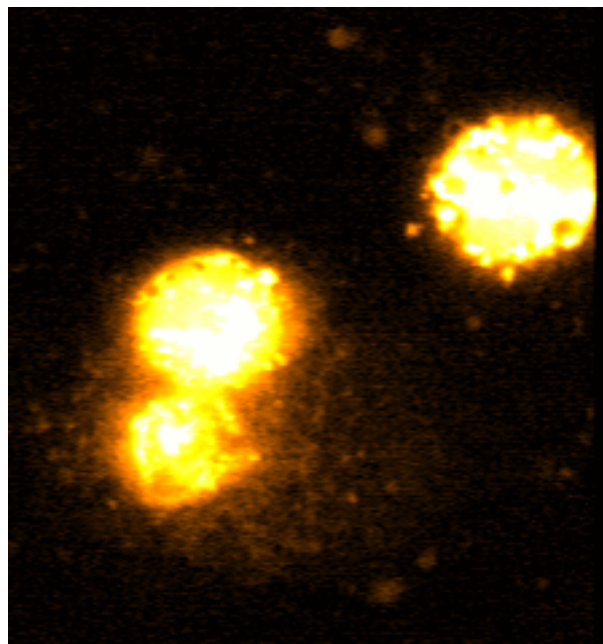


Abb.6: Primäre Epithelzellen von Probe pEC 11 nach Belastung mit TiO₂ für 4 h, gefärbt mit Ethidiumbromid
→ zu starke Eigenfluoreszenz von TiO₂

Die TiO_2 Objektträger wurden deshalb mit 50 μl DAPI gefärbt und ausgewertet (Excitationsfilter 365 nm und Barrierefilter 420 nm). (Abb. 7)

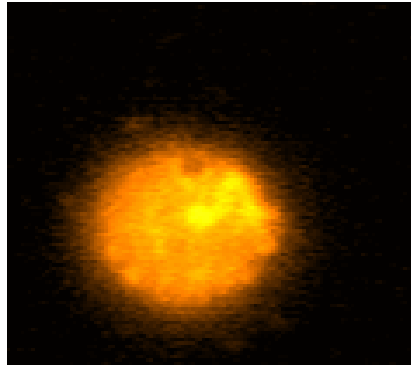


Abb.7: Zelle von Probe pEC 11 nach 4 h Belastung mit TiO_2 $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Gefärbt mit DAPI

3.4 Statistische Analyse

In den Balkendiagrammen aus Kapitel 4 Ergebnisse sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Auswertungen des Olive Tail Moment (OTM) einer Zellprobe dargestellt. Der OTM Wert ist das Produkt aus Schweiflänge und relativer Schweifintensität:

$$|m_K m_S| \times \text{DNA}_{\text{Schweif}}$$

$|m_K m_S|$ ist in diesem Fall der Abstand zwischen Massenmittelpunkt des Kometenkopfes und Massenmittelpunkt des Schweifes.

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Students t-Test durchgeführt. Dabei wurden die Mittelwerte der Testsubstanzen im Vergleich zur Mediumkontrolle berechnet. Des Weiteren wurde das Programm SPSS 11.0 für Windows für die Bearbeitung der Boxplotdarstellungen eingesetzt. Werte von $p < 0.05$ und $p < 0.01$ wurden als signifikant (*) und (**), Werte von $p < 0.001$ als hochsignifikant (***) eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1 Vitalität der Primärzellen bei Ankunft in Giessen

Die Vitalität der Primärzellen bei Ankunft im Untersuchungslabor (Giessen) vor der Einsaat der Zellen lag durchschnittlich bei allen 55 Biopsieproben um etwa 86 %. Die höchste Vitalität lag bei 97 % und die niedrigste bei 57 %. Von 55 eingegangenen Proben hatten 50 (91%) eine Vitalität von >70 %. Es stellte sich heraus, dass auch Proben, die mit einer geringeren Vitalität als 70 % ankamen, sich nach den zwei Ruhetagen erholten (Vitalität >70 %) und somit alle Proben mit den gleichen Grundbedingungen in den Versuch gingen.

4.1.1 Löseverhalten der untersuchten Partikel

Beim Lösen der zu untersuchenden Stoffe zeigte sich TiO_2 als am besten löslich. In KSF-Serumfreien Medium löste sich TiO_2 schnell und bildete eine milchige Suspension.

Schlechter lösten sich Quarz und der Zement G. Hier waren auch nach mehrmaligem resuspendieren mit der Pipette noch große Partikel in einer durchsichtigen Suspension zu sehen. Am schlechtesten löste sich Zement H1. Die hier gelösten Partikel verkleinerten sich erst nach 15 min Ultraschallbehandlung. Nach der Ultraschallbehandlung ergab sich aber aus allen Partikeln eine gleichmäßige Suspension. Das Löslichkeitsverhalten spiegelte sich auch im Verhalten der Partikel auf den Zellen beim Abwaschen mit PBS-Puffer nach der vierstündigen Inkubation wider. Besonders schwierig ließen sich die gut gelösten TiO_2 Partikel von den Zellen abwaschen, aber auch die Zemente und die Positivkontrolle Quarz waren durch das Abwaschen mit PBS-Puffer nie rückstandsfrei von den Zellen zu entfernen.

4.1.2 Mikroskopisches Bild der Primärzellen nach vierstündiger Exposition

Als Vergleich und zur optischen Darstellung, hier einige ausgewählte digitalisierte Photos in 400 facher Vergrößerung von Zellen verschiedener Proben nach vierstündiger Exposition. Im mikroskopischen Bild zeigten die Kontrollzellen, die nur in Medium (Abb. 8) oder TiO_2 (Abb. 9) exponiert worden waren, nach dem Comet-Assay, eine glatte und völlig intakte, runde Oberfläche.

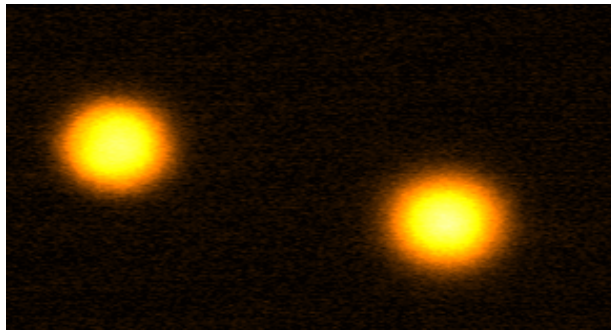


Abb.8: Zellen von Probe pEC 16. Die Zellen sind nach 4 h in Medium unversehrt, rund.

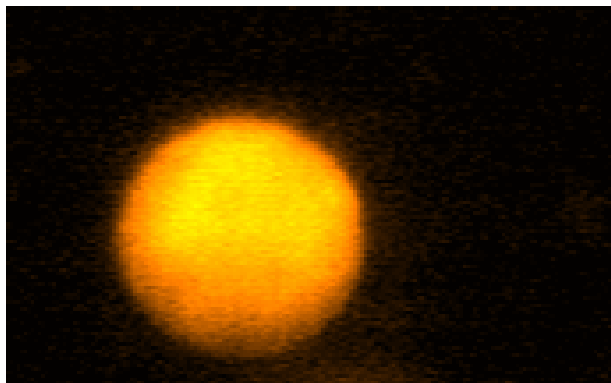


Abb.9: Zelle von Probe pEC 16, Negativkontrolle, rund und unversehrt nach 4 h Belastung mit TiO_2 ($200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Nach Exposition der Zellen mit dem Zement H1, waren nach morphologischer Untersuchung bei den Zellen deutliche DNA-Schäden zu erkennen (Abb. 10). Die Ränder wirkten ausgefranst, wobei die Zellen dennoch häufig einen weitestgehend runden Eindruck machten. Nach Belastung der Zellen mit dem Zement G (Abb. 11), waren deutlich weniger häufig DNA-Schäden im Vergleich zu Zement H1 zu beobachten.

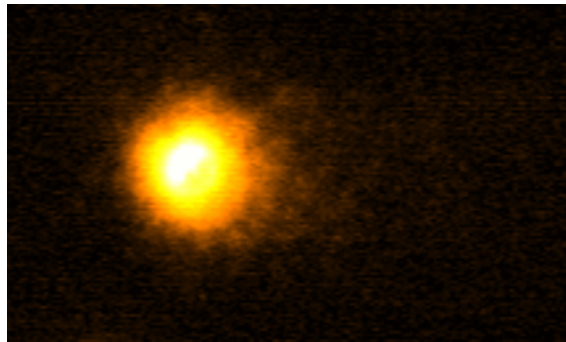


Abb.10: Zelle von Probe pEC 18 nach 4 h Belastung mit Zement H1 ($200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Mittelgroßer Kometenschweif.

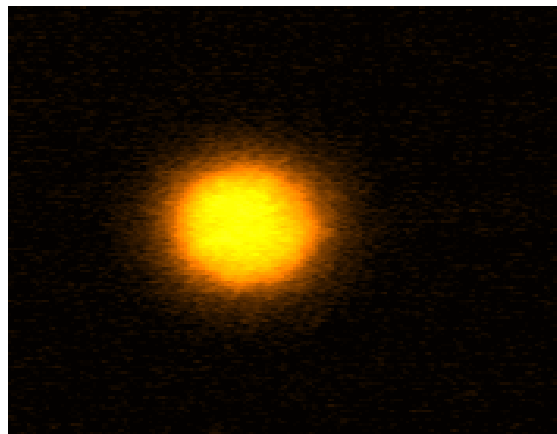


Abb.11: Zelle von Probe pEC 13 nach 4 h Belastung mit Zement G ($200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Zelle leicht „ausgefranst“.

Nach der Behandlung der Zellen mit Quarz waren mittelstarke bis starke Kometenschweife an den Zellen zu erkennen (Abb. 12). Die stärksten Schäden verursachte Benzo(a)pyren (Abb. 13). Hier waren die Zellen teilweise stark beschädigt und ein großer Anteil der DNA war aus der Zellwand ausgetreten.

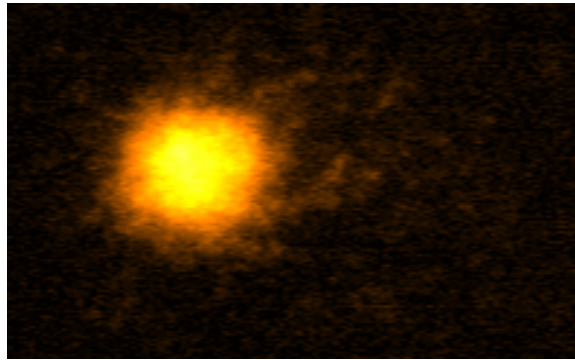


Abb.12: Zelle von Probe pEC 12 Positivkontrolle, nach 4 h Belastung mit Quarz ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). „Starker“/langer Kometenschweif.

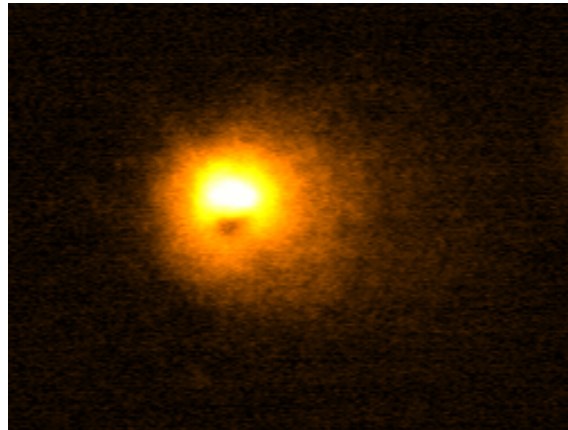


Abb.13: Zelle von Probe pEC 18 Positivkontrolle, nach 4 h Belastung mit B[a]P ($200 \mu\text{mol}/\text{L}$). Sehr langer Kometenschweif.

4.2 Zytotoxizität und DNA-Schäden

Zytotoxizität

Von allen 55 Proben primärer Epithelzellen reagierten 14 Proben (26%) zytotoxisch (Vitalität niedriger als 70%) nach 4 h Exposition in der Negativ-Partikelkontrolle TiO_2 . Davon stammten 8 Proben (26%) aus der Gruppe von Patienten ohne Tumor (Non-TU) und 6 Proben (25%) aus der Gruppe von Patienten mit Tumor (TU). Weiterhin reagierten von den 55 Proben 9 Proben (16 %) zytotoxisch nach vierstündiger Exposition in Zement **H1** im Vergleich zur Mediumkontrolle (2%) (Tab. 7). Hiervon stammten 5 Proben (16%) aus der Gruppe der Patienten ohne Karzinom (Non-TU) und 4 Proben (17%) von Patienten mit Karzinom (TU). Im Vergleich dazu reagierten nach 4 h Exposition mit Zement **G** nur 6 von

55 Proben zytotoxisch (11%). Hierbei stammten 3 Proben (10%) aus der Gruppe der gesunden Patienten und 3 Proben (13%) aus der Gruppe von Patienten mit Larynx-Pharynx-Tumor. Die Positivkontrolle **Quarz** reagierte in 14 Proben (25 %) zytotoxisch im Vergleich zur Mediumkontrolle und **B[a]P** in 19 Proben (35 %). Von den mit Quarz behandelten Proben, die mit einer erhöhten DNA-Migration reagierten stammten 9 Stück (29%) aus der Gruppe der Non-TU Patienten und 5 Proben (21%) aus der TU-Gruppe. Von den Proben die mit B[a]P behandelt wurden und positiv reagierten stammten 10 (32%) aus der Non-TU Gruppe und 9 Proben (38%) aus der TU-Gruppe (Tab.7).

Tab.7: Zusammenfassung der Zytotoxizität von allen 55 Proben und der Kontrollgruppen ohne Larynx-Pharynx Karzinom (Non-TU) und mit Karzinom (TU).

Zytotoxizität (Zellvitalität < 70%)	Total 55 (100%)	Non-TU 31 (100%)	TU 24 (100%)
Medium	2 (4%)	1 (3%)	1 (4%)
TiO ₂	14 (26%)	8 (26%)	6 (25%)
Zement H1	9 (16%)	5 (16%)	4 (17%)
Zement G	6 (11%)	3 (10%)	3 (13%)
Quarz DQ12	14 (25%)	9 (29%)	5 (21%)
B[a]P	19 (35%)	10 (32%)	9 (38%)

DNA-Schäden

Zur Auswertung wurden alle 55 ermittelten Ergebnisse herangezogen, auch diejenigen, bei denen Zytotoxizität (= Zellvitalität < 70%) gefunden wurde, da bei den Primärzellen von einer erhöhten Empfindlichkeit ausgegangen wird. Von insgesamt 55 Proben (pEC 10 - 64) primärer Epithelzellen reagierten 5 Proben (9%) nach 4 h Belastung mit der Negativ-Partikelkontrolle **TiO₂** mit einer signifikant erhöhten DNA-Migration, wovon 2 Proben (7%) aus der Gruppe der Non-TU (Nicht an einem Tumor erkrankten) Patienten stammten und 3 Proben (13%) aus der TU-Gruppe (an einem Larynx-Pharynx-Tumor erkrankt) (Tab. 8, Abb.14). Weiterhin zeigten von 55 Proben 41 (75 %) signifikant vermehrte DNA-Schäden nach 4 h Exposition gegenüber Zement **H1** im Vergleich zur Mediumkontrolle (Tab.8, Abb.15). Davon stammten 22 Proben (71%) aus der Gruppe der Patienten ohne Karzinom (Non-TU) und 19 Proben (79%) von Patienten mit Karzinom (TU). Im Gegensatz dazu zeigte Zement **G** nur in 26 von 55 Zellproben (47 %) eine verstärkte DNA-Migration (Tab. 8,

Abb.16). Hierbei stammten 14 Proben (45%) aus der Non-TU Gruppe und 12 Proben (50%) aus der TU-Gruppe. Die Positivkontrolle **Quarz** zeigte in allen 55 Proben (100 %) signifikanten DNA-Schaden nach vierstündiger Exposition im Vergleich zur Mediumkontrolle (Tab. 8, Abb.17). In diesem Falle zeigte sich ein signifikanter Anstieg der DNA-Migration in allen Proben beider Patientengruppen (100% der Non-TU und TU-Gruppe). Für **Benzo(a)pyren (B[a]P)** wurde in 54 von 55 Proben (98 %) eine verstärkte DNA-Migration nachgewiesen (Tab. 8, Abb.18), also in 30 Proben (97%) der Non-TU Patientengruppe und in allen 24 Proben der TU-Gruppe (100%).

Tab.8: Zusammenfassung der DNA-Schäden von allen 55 Proben und der Kontrollgruppen ohne Larynx-Pharynx Karzinom (Non-TU) und mit Karzinom (TU).

DNA-Schäden	Total	Non-TU	TU
p< 0,05	55 (100%)	31 (100%)	24 (100%)
Medium	0	0	0
TiO ₂	5 (9%)	2 (7%)	3 (13%)
Zement H1	41 (75%)	22 (71%)	19 (79%)
Zement G	26 (47%)	14 (45%)	12 (50%)
Quarz DQ12	55 (100%)	31 (100%)	24 (100%)
B[a]P	54 (98%)	30 (97%)	24 (100%)

Die Induktionsfaktoren der DNA-Migration in pEC durch die Prüfsubstanzen im Vergleich zur Mediumkontrolle sind in Tab. 9 zusammengefasst und im Anhang in Tab. 16 einzeln aufgeführt. Die Induktion erreichte bei TiO₂ einen Anstieg von 0.4fach bis 3.94fach, bei Zement H1 1.05fach bis 7.44fach, bei Zement G 0.85fach bis 4.38fach, bei Quarz 1.30 bis 7.90fach und bei B[a]P 1.23fach bis 13.27fach.

Tab. 9: Induktionsfaktoren (Minimum-Maximum) der DNA-Migration in pEC durch die Prüfsubstanzen im Vergleich zur Mediumkontrolle

Testsubstanzen	Induktionsfaktoren
TiO ₂	0.4 – 3.94
Zement H1	1.05 – 7.44
Zement G	0.85 – 4.38
DQ12	1.30 – 7.90
B[a]P	1.23 – 13.27

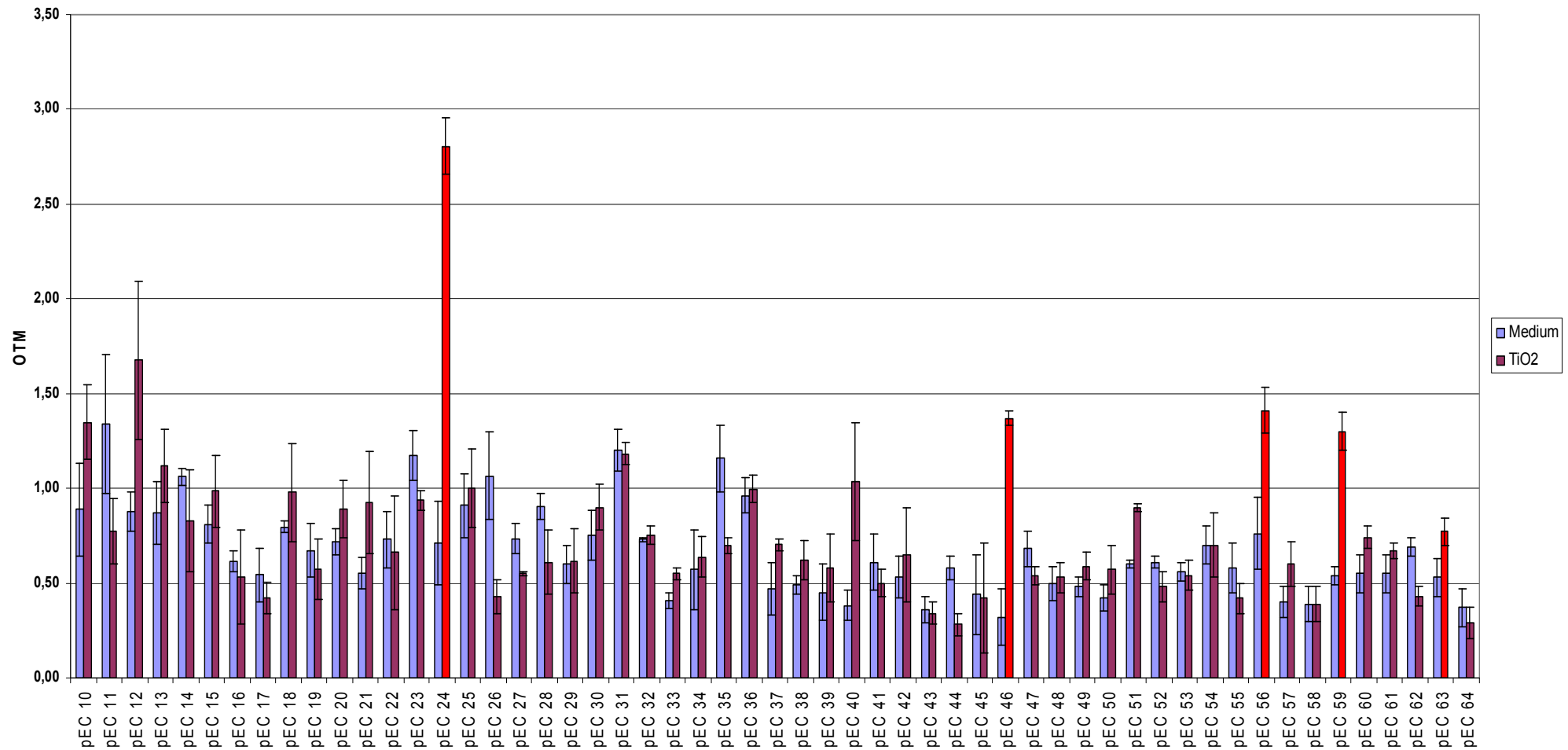


Abb.14: Effekte von TiO_2 ($200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf DNA (Strangbrüche im Comet Assay) in primären Epithelzellen pEC 10 – 64 nach 4 h Exposition im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des OTM mit Standardabweichung von jeweils drei parallelen Messungen einer Zellprobe. Die roten Balken zeigen statistische Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zur Mediumkontrolle.

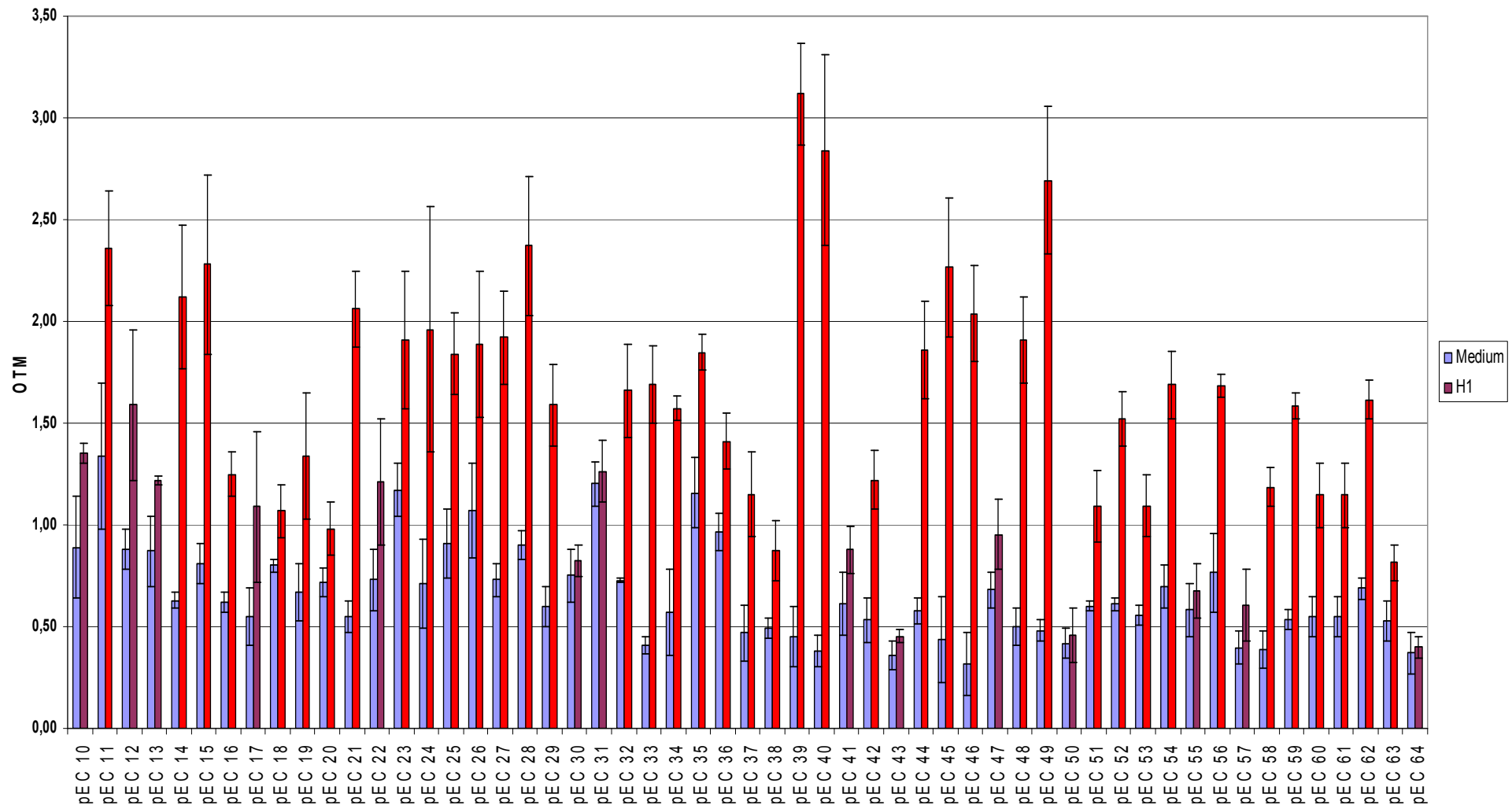


Abb.15: Effekte von **Zement H1** (200 µg/cm²) auf DNA (Strangbrüche im Comet Assay) in primären Epithelzellen pEC 10 – 64 nach 4 h Exposition im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des OTM mit Standardabweichung von jeweils drei parallelen Messungen einer Zellprobe. Die roten Balken zeigen statistische Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zur Mediumkontrolle.

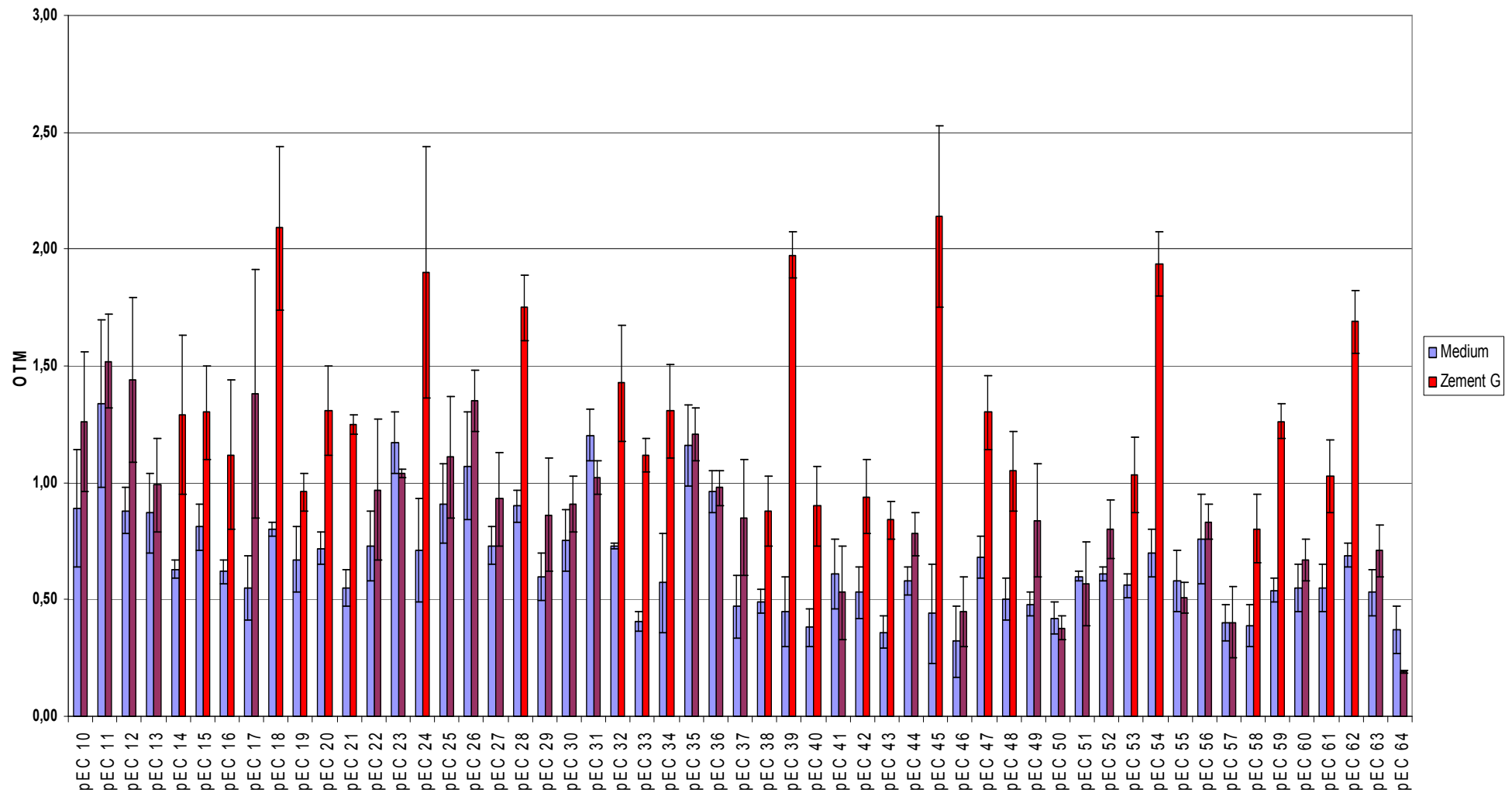


Abb.16: Effekte von **Zement G** (200 µg/cm²) auf DNA (Strangbrüche im Comet Assay) in primären Epithelzellen pEC 10 – 64 nach 4 h Exposition im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des OTM mit Standardabweichung von jeweils drei parallelen Messungen einer Zellprobe. Die roten Balken zeigen statistische Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zur Mediumkontrolle.

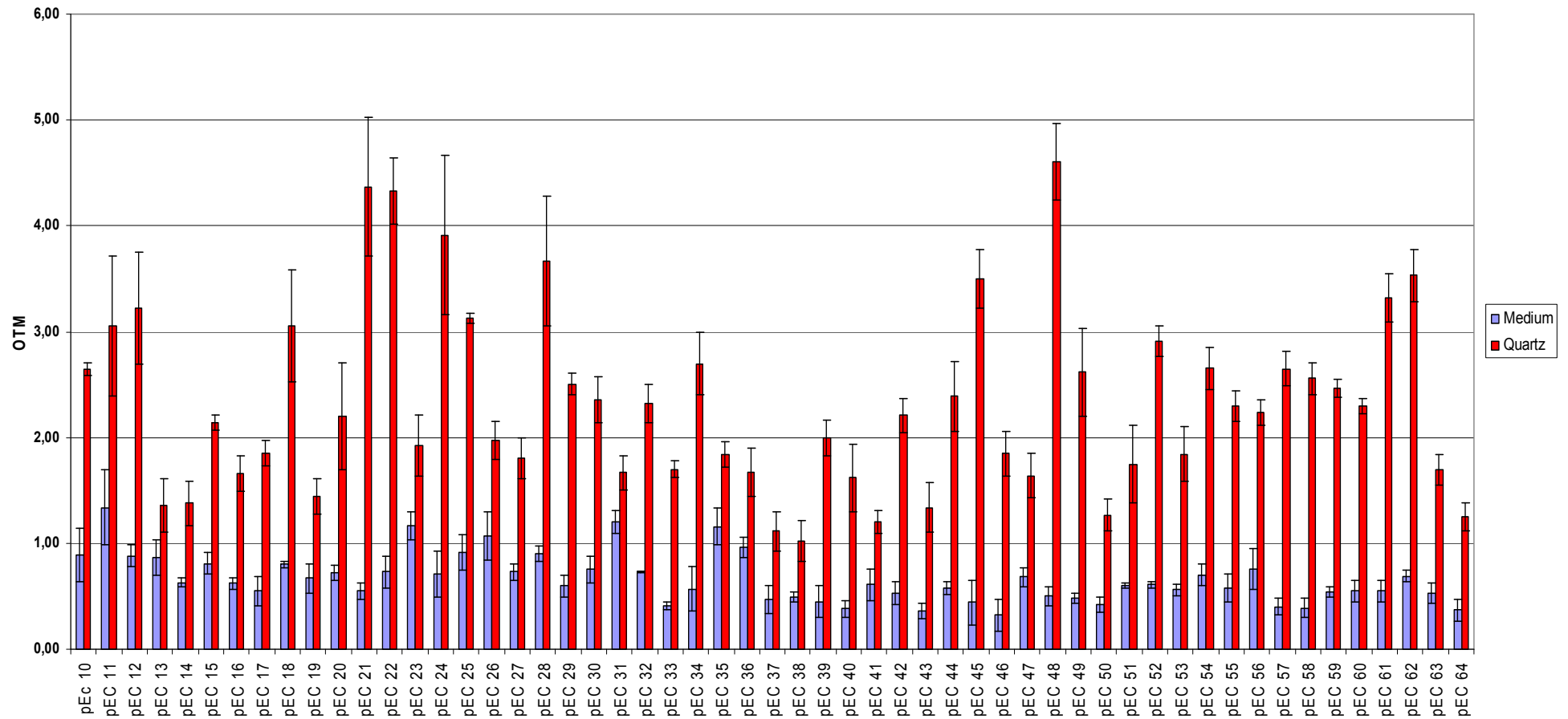


Abb.17: Effekte von **Quarz** ($200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) auf DNA (Strangbrüche im Comet Assay) in primären Epithelzellen pEC 10 – 64 nach 4 h Exposition im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des OTM mit Standardabweichung von jeweils drei parallelen Messungen einer Zellprobe. Die roten Balken zeigen statistische Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zur Mediumkontrolle.

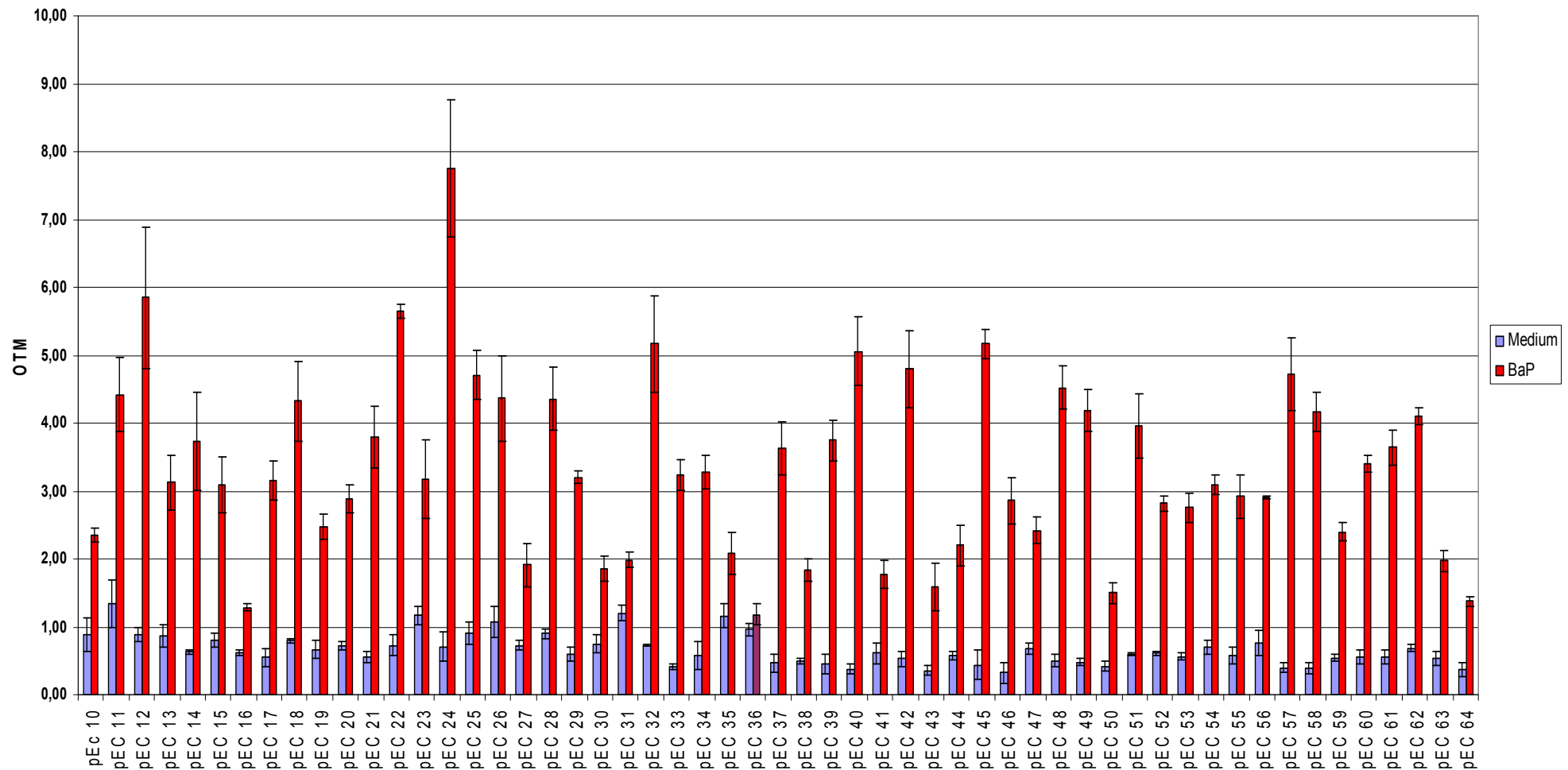


Abb.18: Effekte von **Benzo[a]pyren** (200 $\mu\text{m}/\text{L}$) auf DNA (Strangbrüche im Comet Assay) in primären Epithelzellen pEC 10 – 64 nach 4 h Exposition im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des OTM mit Standardabweichung von jeweils drei parallelen Messungen einer Zellprobe. Die roten Balken zeigen statistische Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zur Mediumkontrolle.

4.3 DNA-Migration im Comet Assay

Nach der Analyse aller 55 Biopsieproben zeigte sich, dass die Zemente H1 und G signifikante DNA-Schäden im Vergleich zur Mediumkontrolle verursachen. Der **Zement H1** verursachte einen Median des Olive Tail Moments (OTM) von 1,57 (SEM 0,1) in der Kontrollgruppe (N = 31, Non-Tumor-Zellen) und 1,35 (SEM 0,13) in der Gruppe der Tumorpatienten (N = 24, Tumor-Zellen) im Vergleich zu 0,62 (SEM 0,07) (Non-Tumor) und 0,58 (SEM 0,05) (Tumor) der Mediumkontrolle. Die P-Werte für DNA-Schäden nach einer Belastung mit Zement H1 waren $p < 0,001$ für Patienten ohne Larynx-Pharynx Karzinom und $p < 0,001$ für Patienten mit Karzinom. Zwischen den Patientengruppen konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der OTM Werte nach der Behandlung der Proben mit Medium ($p = 0,401$) und Zement H1 ($p = 0,281$) gefunden werden (Tab. 10, Abb.19 und 20).

Nach der Behandlung der Proben mit **Zement G** lag der Median des OTM bei 1,04 (SEM 0,08) und bei 1,00 (SEM 0,08) (Tumor) im Vergleich zur Mediumkontrolle (0,62 Non-Tumor und 0,58 Tumor). Die P-Werte der DNA-Schäden lagen bei 0,001 in der Non-Tumor Gruppe und bei 0,001 in der Tumorguppe. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede des OTM zwischen den Patientengruppen (0,401 Medium und 0,281 Zement G, jeweils Non-Tumor im Vergleich zur Tumorguppe) gefunden werden (Tab.10, Abb.19 und 21).

Die negative Partikelkontrolle **TiO₂** verursachte in den 55 Biopsieproben keine signifikanten DNA-Schäden im Vergleich zur Mediumkontrolle. TiO₂ verursachte einen Median des OTM von 0,64 (SEM 0,09) (Non-Tumor) und 0,68 (SEM 0,06) (Tumor) im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die P-Werte für DNA-Schäden nach einer Behandlung der Proben mit TiO₂ waren 0,288 (Non-Tumor) und 0,171 (Tumor). Die Patientengruppen mit und ohne Larynx-Pharynx Karzinom zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den OTM Werten nach der Behandlung mit Medium (0,401) und TiO₂ (0,734) (Tab. 10, Abb. 19 und 22).

Die positive Partikelkontrolle **Quarz (DQ 12)** verursachte in allen 55 Biopsieproben signifikante DNA-Schäden im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der Median des Olive Tail Moments (OTM) von Quarz lag bei 2,32 (SEM 0,18) in der Kontrollgruppe (Non-Tumor) und bei 2,10 (SEM 0,12) in der Gruppe der Tumorpatienten (Tumor) im Vergleich zu 0,62 (Non-Tumor) und 0,58 (Tumor) der Mediumkontrolle. Die P-Werte für DNA-Schäden nach einer Belastung mit Quarz waren $p < 0,001$ für Patienten ohne Larynx-Pharynx Karzinom und $p < 0,001$ für Patienten mit Karzinom. Zwischen den Patientengruppen konnten keine

signifikanten Unterschiede beim Vergleich der OTM Werte nach der Behandlung der Proben mit Medium ($p = 0,401$) und Quarz ($p = 0,315$) gefunden werden (Tab. 10, Abb.19 und 23). Auch die Positivkontrolle **Benzo[a]pyren** verursachte in den Biopsieproben signifikante DNA-Schäden im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der Median des Olive Tail Moments (OTM) lag nach einer Behandlung der Proben mit B[a]P bei 3,15 (SEM 0,27) (Non-Tumor) und bei 3,22 (SEM 0,22) (Tumor) im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die P-Werte für DNA-Schäden nach einer Belastung mit Quarz waren $p < 0,001$ für Patienten ohne Larynx-Pharynx Karzinom und $p < 0,001$ für Patienten mit Karzinom. Zwischen den Patientengruppen konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der OTM Werte nach der Behandlung der Proben mit Medium ($p = 0,401$) und B[a]P ($p = 0,794$) gefunden werden (Tab. 10, Abb.19 und 24).

Tab.10: Sensibilität gegenüber DNA-Schäden von humanen primären Mukosazellen von Patienten mit und ohne Larynx-Pharynx-Karzinom

	Medium	TiO ₂	Zement H1	Zement G	Quarz	B[a]P	P-Werte (Medium vs. Testsubstanzen)
OTM (Non-TU)	0,62 (0,07)	0,64 (0,09)	1,57 (0,10)	1,04 (0,08)	2,32 (0,18)	3,15 (0,27)	$< 0,001$
OTM (TU)	0,58 (0,05)	0,68 (0,06)	1,35 (0,13)	1,00 (0,08)	2,10 (0,12)	3,22 (0,22)	$< 0,001$
P-Werte (Non-TU vs. TU)	$< 0,401$	$< 0,734$	$< 0,281$	$< 0,367$	$< 0,315$	$< 0,794$	

Median OTM mit S.E.M. in Klammern für Patienten ohne (Non-TU: N = 31) und mit Larynx-Pharynx Karzinom (TU: N = 24) nach 4 h Inkubation in Medium und TiO₂ (200 µg/cm²) als Negativkontrollen, Zement H1 und G (200 µg/cm²), Quarz (100 µg/cm²) als positive Partikelkontrolle und B[a]P (200 µmol/L) als Postitivkontrolle für die allgemeine Sensitivität der Zellen. Die P-Werte zeigen nach Berechnung mit dem Mann-Whitney Test jeweils den Vergleich der Effekte der Testsubstanzen (TiO₂, Zement H1 und G, Quarz und B[a]P) im Vergleich zur Mediumkontrolle (P-Werte Medium vs. Testsubstanzen). Die OTM Werte der Kontrollgruppe (Non-TU) werden verglichen mit den OTM Werten der Tumorgruppen (TU) nach der Behandlung der Proben mit den Testsubstanzen (P-Werte Non-TU vs. TU).

DNA-Schäden aller Substanzen in allen 55 Proben:

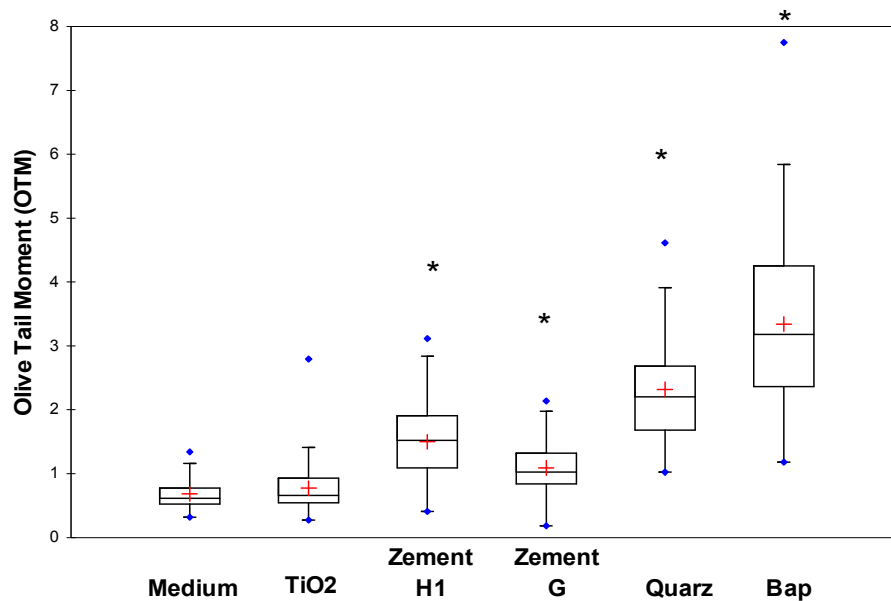


Abb.19: Ergebnisse des Comet Assays in humanen primären oropharyngeal Mukosazellen nach der Behandlung mit Medium, TiO₂ als negative Partikelkontrolle (200 µg/cm²), den Zementen H1 und G (200 µg/cm²), der positiven Partikelkontrolle Quarz (100 µg/cm²) und der Positivkontrolle Benzo[a]pyren (B[a]P, 200 µmol/L). Die Boxplots zeigen die niedrigsten und höchsten OTM Werte, sowie das erste und dritte Quartil und den Median (y-Achse). Die Werte wurden aus allen 55 untersuchten Biopsieproben ermittelt.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch einen * markiert.

DNA-Schäden jeweils einer Substanz in Kontroll- und Tumorgruppe (Abb. 20 – 24)

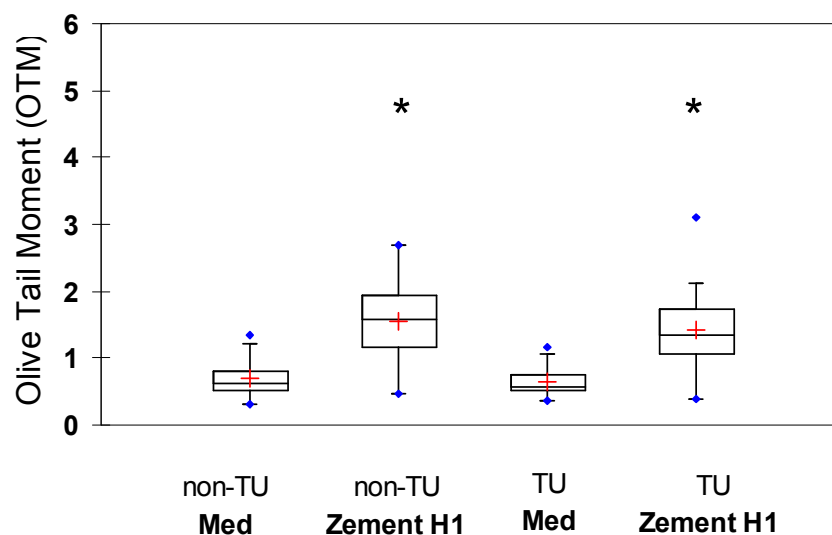


Abb.20: Ergebnisse des Comet Assays in humanen primären oropharyngeal Mukosazellen nach der Behandlung mit Medium (Med) und Zement H1 (200 µg/cm²) für 4 h. Die Boxplots zeigen die niedrigsten und höchsten OTM Werte, sowie das erste und dritte Quartil und den Median y-Achse). Dargestellt sind jeweils die Werte der Kontrollgruppe (non-TU) und der Gruppe der Patienten mit Larynx-Pharynx Karzinom (TU).

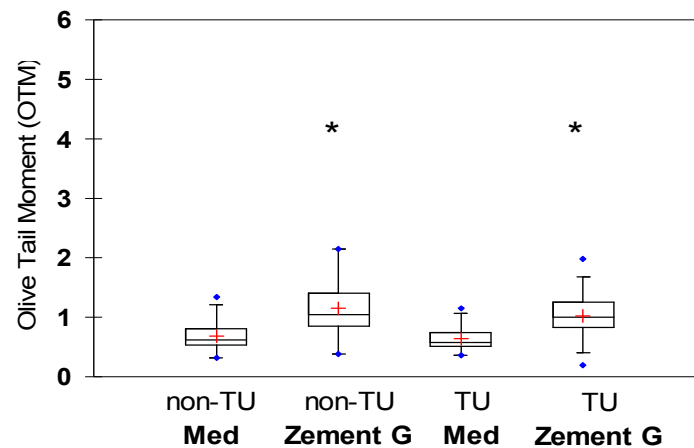


Abb.21: Ergebnisse des Comet Assays in humanen primären oropharyngeal Mukosazellen nach der Behandlung mit Medium (Med) und Zement G (200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) für 4 h. Die Boxplots zeigen die niedrigsten und höchsten OTM Werte, sowie das erste und dritte Quartil und den Median (y-Achse). Dargestellt sind jeweils die Werte der Kontrollgruppe (non-TU) und der Gruppe der Patienten mit Larynx-Pharynx Karzinom (TU). Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit einem * markiert.

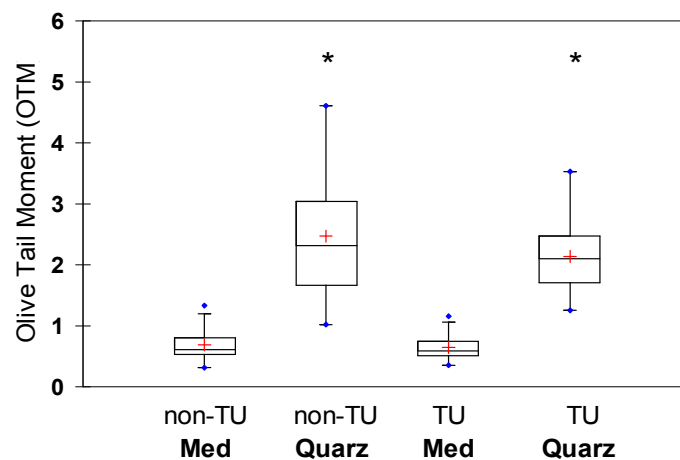


Abb.22: Ergebnisse des Comet Assays in humanen primären oropharyngeal Mukosazellen nach der Behandlung mit Medium (Med) und Quarz als positive Partikelkontrolle (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) für 4 h. Die Boxplots zeigen die niedrigsten und höchsten OTM Werte, sowie das erste und dritte Quartil und den Median (y-Achse). Dargestellt sind jeweils die Werte der Kontrollgruppe (non-TU) und der Gruppe der Patienten mit Larynx-Pharynx Karzinom (TU). Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit einem * markiert.

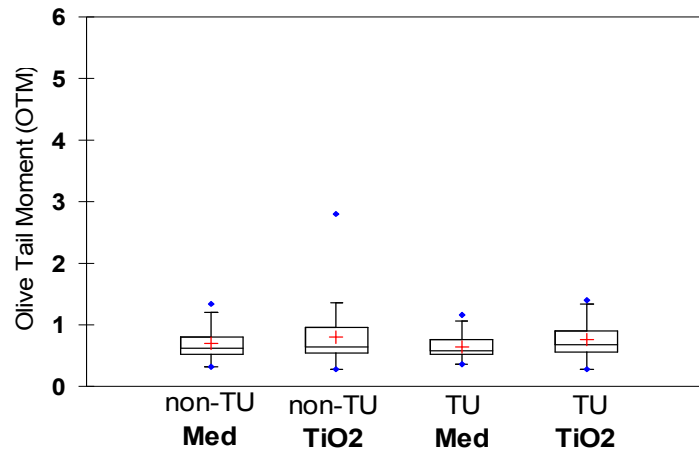


Abb.23: Ergebnisse des Comet Assays in humanen primären oropharyngeal Mukosazellen nach der Behandlung mit Medium (Med) und TiO₂ als negative Partikelkontrolle (200 µg/cm²) für 4 h. Die Boxplots zeigen die niedrigsten und höchsten OTM Werte, sowie das erste und dritte Quartil und den Median (y-Achse). Dargestellt sind jeweils die Werte der Kontrollgruppe (non-TU) und der Gruppe der Patienten mit Larynx-Pharynx Karzinom (TU).

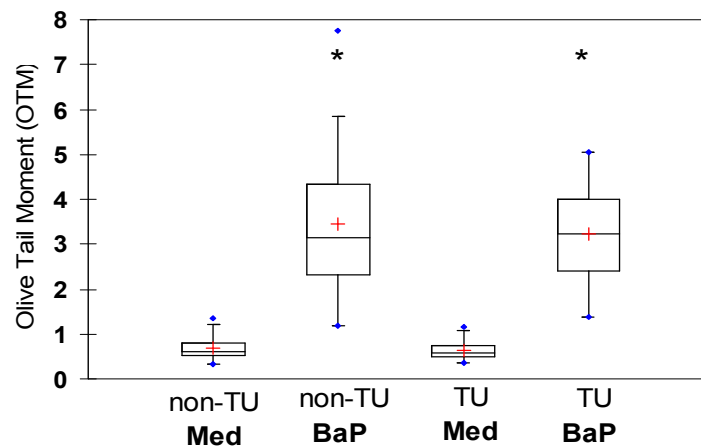


Abb.24: Ergebnisse des Comet Assays in humanen primären oropharyngeal Mukosazellen nach der Behandlung mit Medium (Med) und Benzo[a]pyren als Positivkontrolle (200 µmol/L) für 4 h. Die Boxplots zeigen die niedrigsten und höchsten OTM Werte, sowie das erste und dritte Quartil und den Median (y-Achse). Dargestellt sind jeweils die Werte der Kontrollgruppe (non-TU) und der Gruppe der Patienten mit Larynx-Pharynx Karzinom (TU). Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit einem * markiert.

Bitte die im Vergleich zu den Abb. 20 – 23 unterschiedliche y-Achsenkalierung bis 8 beachten!

5. Diskussion

Das Interesse für diese Untersuchung wurde durch die 1998 durchgeführte Rhein-Neckar-Studie zur molekularen Epidemiologie des Larynxkarzinoms geweckt, in welcher entdeckt wurde, dass das Risiko für Bauarbeiter und Konstrukteure, im Atemwegsbereich an Krebs zu erkranken, durch eine jahrelange Belastung mit diversen Staubpartikeln erhöht wird. Man fand bei Probanden, die auf dem Arbeitsplatz Zementstaub ausgesetzt waren, eine erhöhte Erkrankungsrate (Odd ratio = 2,42). Dieses Ergebnis war Auslöser für die Frage nach der Wirkung von Zementstaub auf zellulärer Ebene und dem damit verbundenen Prozess der Tumorentstehung bei Kehlkopfkrebs.

5.1 Widersprüchliche Daten in der Literatur

Neben vielen Hinweisen auf negative gesundheitliche Effekte bei Zementarbeitern durch Zementstaub (siehe auch Tab. 17 im Anhang), wie z.B. nasale Malignome (VAN DEN OEVER, 1996) oder Kollorektalkrebs (JAKOBSSON et al., 1990) gibt es wie bereits in der theoretischen Einführung erwähnt, Untersuchungsergebnisse, in denen keine Effekte gefunden werden (siehe auch Tab. 18 im Anhang). In einer weiteren Untersuchung konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Arbeit mit Zementstaub das Risiko erhöht, an Lungenkrebs, Atemwegserkrankungen, Bronchitis, einem Lungenemphysem oder Asthma zu erkranken (MC DOWALL, 1984). Auch VESTBO et al. (1991) konnte in einer Kohortenstudie, trotz einer relativ hohen gemessenen mittleren Konzentration an löslichem CrO_4^{2-} in Zement (1974 gemessen), kein erhöhtes Risiko für Arbeiter in Zementfabriken feststellen, an Larynx- oder Magenkrebs zu erkranken.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass gerade Kohortenstudien einen Mangel an Genauigkeit aufweisen. Es ist schwierig, die Historie eines Arbeiterlebens genau zu erfassen, um die Zeit der Exposition zu bestimmen. Auch verschwimmen Daten und Zeiten in der Erinnerung der Probanden und die Angaben sind nicht genau. Darüber hinaus ist es schwierig, geeignete Kontrollgruppen zu finden. Querschnittsuntersuchungen von Populationsdaten aus großstädtischen Regionen werden häufig kritisiert, da sie die Einflüsse von Zigarettenrauchen und anderen Gesundheitsrisiken oft nicht ausschließen können. Zudem sind in vielen

Untersuchungen keine genauen Angaben über die Staubkonzentration/Staubbelastung angegeben (LARAQUI HOSSINI, 2002, MEO et al., 2002).

Die einzige Arbeitsgruppe, die Zementpartikel auf Gentoxizität untersuchte, war eine Forschergemeinschaft um RIBEIRO (2006). Sie fanden im Comet Assay keine Effekte in chinesischen Hamsteroarialzellen (CHO K-1) nach der Exposition mit Portland Zement. Was aus der Beschreibung der Methode nicht hervorgeht ist, wie die Zemente gelöst wurden. Falls diese in FCS-haltigem Medium gelöst wurden, so ist zu vermuten, dass keine Effekte gefunden wurden, da die Zemente vielleicht ähnlich wie Quarz in FCS-haltigem Medium nicht aktiv sein können (Maskierung der Partikel durch FCS).

Für die hier durchgeführte Mutagenitätsstudie sollten deshalb mögliche Zusammenhänge zwischen einer Zementpartikel-induzierten DNA-Schädigung und der Entstehung von Larynx-Pharynx-Karzinomen in humanen *ex vivo*-Zellsystemen (primäre Oropharyngeal Mukosazellen) mit Hilfe des Comet Assays (Einzelzell-Gel-Elektrophorese), als Nachweisverfahren für DNA-Strangbrüche und oxidative DNA-Schäden, evaluiert werden. Der Comet-Assay erwies sich durch seine Sensitivität (geringe Zellzahl nötig), Vielfältigkeit (*in-vitro* und *in-vivo* einsetzbar), geringen Kosten, einfache und schnelle Handhabung als geeignete Methode. Er liefert schnell Informationen über das Ausmaß und die Art (Doppel-, Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und Quervernetzungen) von DNA-Brüchen.

5.2 Reaktionen der verschiedenen Biopsieproben

In der vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, dass kein erkennbarer Unterschied zwischen den Reaktionen (Median OTM) der Biopsieproben von Personen, die bereits an einem Larynx-Pharynx-Karzinom erkrankt sind, und denjenigen von nicht erkrankten Personen gegenüber Zementpartikeln besteht. Die Primärzellen von bereits an einem Larynx-Pharynx-Karzinom erkrankten Probanden reagierten auf die Zemente H1 und G genauso häufig mit verstärkter DNA-Migration wie diejenigen aus gesunden Gewebeproben. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Risiko für bereits an einem Larynx-Pharynx erkrankte Patienten, durch eingeatmete Zementpartikel an Krebs zu erkranken, nicht höher ist als für andere Personen. Auch bei einer Untersuchung von HARRÉUS (2004) fand man keine Unterschiede in

der Anzahl von DNA-Schäden bei Patienten mit und ohne Larynx-Pharynx-Karzinom nach einer Belastung von Mukosazellen mit Benzo(a)pyren-diolepoxid (BPDE).

Dennoch zeigte sich innerhalb der 55 untersuchten Proben eine individuell unterschiedlich starke Reaktion auf Zementstaub. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit von Menschen gegenüber dem Mutagen Zementstaub kann an der jeweiligen individuellen enzymatischen Ausstattung liegen und somit das Risiko an Krebs zu erkranken bei manchen Menschen vergrößern oder verringern. Ein Grund hierfür ist die individuelle DNA-Reparaturkapazität nach Mutagenkontakt und die genetischen Polymorphismen von Detoxifizierungsenzymen des Phase-I- und -II-Stoffwechsels (MATTHIAS et al., 1999). Ein potenzieller Biomarker für die individuelle Krebs susceptibility ist das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). Es zeigte sich in einigen Untersuchungen, dass eine geringe Induzierbarkeit dieses Enzyms mit einer hohen Mutagensensitivität korreliert (BECHER et al., 2001; RAJAEI-BEHBAHANI et al., 2002).

Unterschiedliche Umgebungen, Umweltbedingungen, Lebensräume und Ernährungsgewohnheiten können ebenfalls unterschiedliche Empfindlichkeiten in Menschen zur Folge haben. Dies macht es für viele Studien besonders schwierig, geeignete Kontrollgruppen mit vergleichbaren Lebensgewohnheiten zu finden (BECHER et al., 2002).

Eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von eingeatmeten Partikeln in der Lunge spielen die Alveolar-Makrophagen. Voraussetzung für eine effiziente Partikelbeseitigung ist ihre Motilität und ihre phagozytierenden Funktionen (WARHEIT & HARTSKY, 1993). Sie können je nach Alter, Ernährungszustand, Stressfaktoren usw. individuell unterschiedlich sein.

Große Unterschiede der DNA-Migration können auch auf unterschiedlicher Permeabilität der verschiedenen individuellen Zellen in Bezug auf die Testsubstanzen beruhen. Ebenso können unterschiedliche Radikal-Säuberungs-Fähigkeiten der Zellen (radical scavange capability) oder der Zugang der Testsubstanz oder eines Metaboliten verantwortlich für Unterschiede sein (SINGH et al., 1988).

Die Prädisposition für einen Tumor im Larynx-Pharynx Bereich bedeutet nicht automatisch eine höhere Empfindlichkeit für Zementstaub. Dies spiegelt sich auch darin wider, dass es keine Korrelation zwischen einer verstärkten DNA-Migration durch Quarz und Zementstaub in dieser Untersuchung gab. Eine hohe Empfindlichkeit für Quarz bedeutet nicht automatisch auch eine hohe Sensibilität für Zementpartikel.

5.3 Inhaltsstoffe von Zement

Schädliche Effekte von Zementstaub auf lebende Organismen, können auf den irritierenden, sensibilisierenden und pneumokoniosen Eigenschaften seiner Komponenten beruhen. Die erhöhte DNA-Migration in Primärzellen nach einer Exposition mit Zementstaub, insbesondere des Zements H1, könnte also auch auf dessen Inhaltsstoffe zurückzuführen sein. So enthält der Zement H1 deutlich mehr Chrom, Nickel und Zink als der Zement G. Zement G enthält dagegen mehr Mangan (siehe Tab.4, Kapitel 3).

Chrom

Das als Spurenelement im Zement enthaltene Chrom-VI kommt als mögliche Ursache für eine verstärkte DNA-Migration in Frage, da es als Karzinogen eingestuft (IARC, 1990) und seine allergene Wirkung durch Hautkontakt bestätigt ist. In einer Untersuchung von Arbeitern einer Zementfabrik zeigten 68 von 1000 Arbeitern Symptome von Kontaktdermatitis (VARIGOS & DUNT, 1981; MCDOWALL, 1986). Auch wurde in der industriellen Herstellung und Verarbeitung von Chrom unter Arbeitern eine erhöhte Sterblichkeitsrate in Folge von Lungenkrebs festgestellt (DAVIES, 1984). NORSETH (1977) berichtete, dass Chromkomponenten (Chromtrioxid) eine Ulzeration der nasalen Mucosa, eine Perforation des nasalen Septums, nasale Papillome und eine Staublunge verursachen können. Berufliche Expositionen gegenüber Chrom(VI) sind wiederholt in Konzentrationen von 1 mg/m³ gemessen worden, insbesondere bei der Chromatproduktion, bei diversen Schweißtechniken und dem Verchromungsprozess. Diese Belastung kann durch Inhalation zu erhöhten Chromwerten im Blut, Urin und Geweben führen. In Versuchen an Nagern (Mäuse, Ratten) steigt nach der Applikation von Calciumchromat oder Natriumdichromat unter verschiedenen Versuchsbedingungen die Rate an Adenomen an. Auch können eine Zunahme an Lungentumoren und lokalen Tumoren sowie eine Erhöhung der fötalen Sterblichkeitsrate, häufigere Wachstumsretardierungen, vermehrte Skelettdeformationen und Gaumenspalten auftreten.

In den Rohstoffen finden sich aber nicht nur die Chrompigmente, sondern auch ihre löslichen Komponenten wie Chrom(VI). Erhöhte Raten von Schwester-Chromatid-Austauschen (Chromosomale Aberrationen, höhere Frequenz von Aneuploidie) wurden bei Arbeitern beobachtet, die Chrom(VI) Mischungen in Elektroplattierungsfabriken ausgesetzt waren. Kalium-, Ammonium-, Natriumdichromat und Strontiumchromat verursachten in Versuchen

mit tierischen Zellen *in vivo* und tierischen sowie menschlichen Zellen *in vitro* DNA-Schäden, Genmutationen, Schwester-Chromatid-Austausche, chromosomale Aberrationen, Zelltransformationen und dominant letale Mutationen. Chromat(III) dagegen verursacht in kultivierten tierischen und menschlichen Zellen keine der genannten Schäden (IARC, 1990). Für eine Aufnahme von Chrom über die Luft wurde ein TRK-Wert von $0,1 \text{ mg/m}^3$ festgelegt, berechnet als Chromtrioxid im Gesamtstaub der Luft am Arbeitsplatz (RAITHEL, 1987). Um diesen TRK-Wert für Chromat zu erreichen, müsste beispielsweise der Staubgehalt 4 g/m^3 an 10 ppm Cr(VI)-haltigem Zement betragen. In der Realität kann der Chromgehalt in einer Staubprobe aus der Nähe eines Zementofens 389 mg/kg betragen und in Zementstaubproben 125 mg/kg . Im fertigen Produkt kann der Chromgehalt bei 40 mg/kg liegen (JAKOBSSON et al., 1990).

Mangan

Neben Chrom ist in Zementen auch Mangan in Spuren vorhanden. Mangan ist im Vergleich zu vielen anderen Schwermetallen relativ unproblematisch. Die Gefährlichkeit der meisten Verbindungen ist gering und es wurden praktisch noch nie Vergiftungsfälle durch die orale Aufnahme von Manganverbindungen bekannt. Die chronische Manganaufnahme (Langzeit-Exposition) über die Atemwege als Staub (Manganoxidstaub) ist hingegen toxisch und erhöht das Risiko einer Demenzerkrankung (Manganismus, Manganpneumonie, Manganose) (STREDRICK et al., 2004).

Vanadium

Als kritisch sind auch die Anteile an hochtoxischen Vanadiumverbindungen zu betrachten, wie z.B. Vanadiumpentoxid (V_2O_5) in Flugasche (WHO, 2001). Vanadium ist zwar als Spurenelement wichtig für den menschlichen Organismus, es kann sich aber bei der Aufnahme von zu großen Mengen auch negativ auf die Gesundheit auswirken. Die Hauptquellen aus der Nahrung für Vanadium sind Buchweizen, Sojabohnen, Olivenöl, Sonnenblumenöl, Äpfel und Eier.

Eingeatmeter vanadiumhaltiger Staub hingegen kann Lungenkrebs, Bronchitis und Lungenentzündung verursachen. Die akuten Auswirkungen sind Reizungen der Lunge, des Halses, der Augen und der Nasenhöhlen. Weitere Symptome einer übermäßigen Vanadiumaufnahme sind Herz- und Gefäßkrankheiten, Magen- und Darmentzündungen, Schäden am Nervensystem, Leber- und Nierenblutungen, Hautausschläge, heftiges Zittern und

Paralyse, Nasenbluten und Halsschmerzen, Schwächegefühl, Übelkeit und Kopfschmerzen, Schwindelanfälle oder Verhaltensveränderungen. Vanadium hemmt bestimmte Enzyme in Mäusen und Ratten, was Auswirkungen neurologischer Art hat. Neben den Störungen des Nervensystems können auch Atembeschwerden, Paralyse und Schäden an Leber und Nieren auftreten (RESS et al., 2003). Tierversuche haben gezeigt, dass sich Vanadium als Radikalbildner (ROS, •OH-Radikale) negativ auf die männlichen Geschlechtsorgane auswirkt und es sich in der weiblichen Plazenta anhäuft und in manchen Fällen auch eine Veränderung der DNA hervorrufen kann (CHANDRA et al., 2007). Der BAT-Wert von Vanadiumpentoxid liegt bei einer Abweichung des biologischen Indikators Kreatinin im Urin von 70 µg/g festgelegt in der EG-Richtlinie 67/548/EWG (Marquardt et al., 2004). In der BRD liegt ein MAK-Wert von 0,5 mg/m³ Luft vor.

Kleinsasser (2003) zeigte einen Dosis-abhängigen Effekt von Vanadiumpentoxid auf die DNA-Migration von humanen Lymphozyten. Jedoch zeigten nasale-Epithelzellen keine Sensitivität was zunächst keinen Zusammenhang zwischen direkten gentoxischen Effekten von Vanadiumpentoxid und Larynx-Pharynx-Tumoren erkennen lässt.

Metallionen

Kupfer und Eisen(III)-oxid sind in Zementen als Spurenelement enthalten und von Eisenoxidpartikeln weiß man, dass diese in Alveolarzellen Typ I aufgenommen werden (SOROKIN & BRAIN, 1975). Diese Metallionen können als Übergangionen zur Reduzierung des Wasserstoffperoxids bei der Fenton-Reaktion dienen und so zur Entstehung von Hydroxyl-Radikale führen. Calcium und Aluminium sind bekannt dafür, irritierend auf muköse Membranen zu wirken (ACGIH, 1992).

Quarz

Zwar ist der Gehalt an Quarz in Zement gering (ABRONS et al., 1988; FELL et al., 2003), aber dies vermindert nicht seine Fähigkeiten Gesundheitsschäden zu verursachen, wie z.B. die Staublungenkrankheit (NIOSH, 1994). Quarz ist vom US Department of Health and Human Services im National Toxicology Program (NTP), dem IARC und der DFG als humanes Karzinogen (Gruppe 1 der Karzinogene) eingestuft (IARC, 1997; US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2001; DFG, 1999). Es bewirkt ab einer Konzentration von 40 µg/cm² DNA-Schäden (Strangbrüche) in Alveolarzellen von Ratten (RLE) und Menschen

(A549), gesteuert durch die Hydroxylradikal erzeugenden Eigenschaften der Partikel, die an zytotoxischen, inflammatorischen und fibrogenen Effekten beteiligt sind und zur Bildung von 8-OHdG führen (durch $\cdot\text{OH}$). Dies wird deutlich durch die Anwesenheit von Hydroxyl-Radikalfängern (Mannitol), Katalase oder DMSO, durch welche der Schaden verringert wird. Bei Anwesenheit von Superoxiddismutase und Wasserstoffperoxid nimmt der DNA-Schaden zu. Da Hydroxylradikale eine extrem kurze Halbwertszeit haben, nimmt man an, dass die Effekte durch die direkte Bindung von Quarzpartikeln an die DNA verursacht werden. Die in vivo beobachteten gentoxischen Effekte sind vermutlich eine Konsequenz der Fähigkeit der Stäube, entzündliche Prozesse in der Lunge auszulösen (in Alveolarzellen) mit einer starken Bildung von ROS (freien Sauerstoffradikalen) durch aktivierte Neutrophile Zellen und Makrophagen. Die von Quarz verursachten DNA-Schäden entstehen unabhängig von den inflammatorischen Effekten. Ab einer Konzentration von $200\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nimmt die Lebenstüchtigkeit der A549 Zellen ab (SCHINS et al., 2002).

Ebenfalls zu beobachten ist, dass die Größe von Quarzpartikeln eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. In Arbeiten mit synthetisch hergestellten Partikeln wurde demonstriert, dass monodisperse Suspensionen des chemisch inerten Silicasols der Größen 40 und 60 nm in Bezug auf Zytotoxizität und Freisetzung der Zytokine IL-6 und KL-8 deutlich wirksamer waren als die größeren Partikel des gleichen Materials (DIABATÉ et al., 2000). Die Modifikation der Oberfläche von Quarzpartikeln mit polyvinylpyridin-N-Oxid (PVNO) oder Aluminiumlaktat führte zu keinen erhöhten DNA-Schäden oder Lactatdehydrogenase-Werten in Lungenepithelzellen, wie es bei nativen Quarzpartikeln der Fall ist (KNAAPEN et al., 2002). In anderen Untersuchungen scheint kristallines Quarz mehr Effekte zu verursachen als amorphes Quarz (ZHONG, 1997).

Die zelluläre Aufnahme und Zytotoxizität von einatembaren Bentonit-Partikeln ist vom Quarzgehalt und der Art der Aktivierung/Vorbehandlung abhängig. Wenn der Quarzgehalt über 4 % liegt, ist eine stärkere Zytotoxizität zu beobachten als bei reinen Quarzpartikeln. Auch verursachen unterschiedliche Quarzproben (auch in Abhängigkeit des Alters, Zeitraum der Lagerung) unterschiedliche Reaktionen, was vermutlich mit einem Kationenaustausch in der Partikeloberfläche zusammenhängt (FUBINI et al., 1995; ÇAKMAK et al., 2004, STONE et al. 2004). Ebenso korreliert ein hoher Quarzgehalt mit einem hohen Eisenanteil, und die durch die Metalle generierten $\cdot\text{OH}$ -Radikale könnten Ursache für eine erhöhte Zytotoxizität sein, welche vermutlich auf die Lyse der Zellmembran zurückzuführen ist (GEH et al., 2005). Zudem können Quarzpartikel bei ihrer Aufnahme durch die Zellmembran diese schädigen,

was zur Lipidperoxidation führen kann (SHI et al., 1994). Dies kann zur Bildung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen führen und somit zur DNA-Schädigung. Dieser Effekt kann durch die Anwesenheit von Übergangsmetallen, wie z.B. Eisen, verstärkt werden (PARK & FLOYD, 1992; KNAAPEN et al., 2002). Auch können die Partikel Einfluss auf den intrazellulären Gehalt an H_2O_2 aus der Fenton-Reaktion, durch die direkte Aktivierung des Proteinkinase C vermittelten Prozesses haben (PERDERIST et al., 1991; GERCKEN et al., 1996).

Flugasche

Die in Zement ebenso enthaltenen Flugaschepartikel sind zytotoxisch und üben einen Einfluss auf Immunreaktionen von Lungenzellen aus, wobei die in Medium unlösliche Fraktion deutlich toxischer und wirksamer ist als die lösliche Fraktion. Unter Umständen wird dies durch den Gehalt an Schwermetallen ausgelöst, die erst nach einiger Zeit oder bei saurem pH in den Lysosomen in Lösung gehen. Für ROFA (Residual oil fly ash) (DREHER et al., 1997) und CFA (Coal fly ash) (SMITH et al., 2000) wurde bereits gezeigt, dass die bioverfügbaren Übergangsmetalle Vanadium und Eisen dabei eine wichtige Rolle spielen. Übergangsmetalle katalysieren die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, reactive oxygen species), wie z.B. des schädlichen $\cdot\text{OH}$ -Radikals, über die Fenton-Reaktion. ROS führen zu DNA-Strangbrüchen, zur Peroxidation von Lipiden und zur Induktion von Entzündungsmediatoren.

Interessant ist, dass bei Inhalationsversuchen an Ratten die ultrafeinen Partikel stärkere Entzündungsreaktionen verursachten als größere Partikel gleicher chemischer Zusammensetzung (OBERDÖRSTER et al., 1994).

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoffpartikel weder von den Alveolarzellen Typ I noch von den Zellen Typ II aufgenommen wurden. Auch wurde nie beobachtet, dass z.B. TiO_2 -Partikel durch die Tight junctions aufgenommen wurden. Die unterschiedlichen Fähigkeiten der Alveolarzellen Partikel aufzunehmen scheint von deren Zusammensetzung abzuhängen (STEARNS et al., 2001).

Zusammenfassend könnten somit die DNA-Schäden in den primären Epithelzellen aus dieser Untersuchung auf die zellschädigenden Eigenschaften einiger Inhaltsstoffe des Zementes zurückzuführen sein. Manganstaub ist toxisch, Chrom ist in der Lage DNA-Schäden, wie Schwester-Chromatid-Austausche, Chromosomale Aberrationen, höhere Frequenzen von Aneuploidie, chromosomale Aberrationen, Zelltransformationen und dominant letale

Mutationen, zu verursachen. Quarz hat neben zytotoxischen, inflammatorischen und fibrogenen Effekten die Eigenschaft, zur Bildung von 8-OHdG und der Freisetzung der Zytokine IL-6 und KL-8 beizutragen. Schließlich sind Vanadium, Metall Ionen, Quarz und Flugasche in der Lage ROS und $\cdot\text{OH}$ -Radikale zu bilden.

5.4 Partikel allgemein

Da Zementstaubpartikel in einem Größenbereich von 0,01 – 200 μm liegen, geht von ihnen die gleiche Gefahr aus wie von allen Feinstäuben. So werden neben kardiovaskulären oder pulmonalen Komplikationen (DOCKERY et al., 1993; POPE et al., 1995) auch erhöhte Lungenkrebsraten mit ihnen in Verbindung gebracht (COHEN & POPE, 1995).

In zahlreichen weiteren Studien wurden nachteilige Wirkungen von Umweltstäuben (PM10) auf die menschliche Gesundheit nachgewiesen (DOCKERY et al., 1992, 1993; PETERS et al., 1997). Mit zunehmender PM10-Konzentration nahm die Wahrscheinlichkeit für Atemwegs- und Herz-Kreislauf-erkrankungen zu. Luftübertragene Partikel aus dem Rhein-Ruhrgebiet erhöhten z.B. in Hamster- und Rattentrachealzellen den Schwesterchromatidaustausch (HORNBERG et al., 1996).

Bis heute ist nicht genau geklärt, welche Partikeleigenschaften (chemisch, physikalische oder biologische) für die Gesundheitseffekte von Bedeutung sind (DIABATÉ & WOTTRICH, 2004). Eine einjährige amerikanische Studie über die Zusammenhänge von Luftverschmutzung durch einatembare Partikel, Feinstäube und saure Aerosole (Schwefeldioxid, Stickstoffdioxid usw.) und der täglichen Sterbewahrscheinlichkeit lässt erkennen, dass der Säuregehalt von Partikeln nicht so wichtig zu sein scheint wie die Massenkonzentration (DOCKERY et al., 1992). STEARNS et al., 2001 vermuten, dass Partikel, die eher zur Aggregatbildung neigen, gefährlicher sind, da sie leichter phagozytiert werden, und Nanopartikel stehen im Verdacht toxischer zu sein als größere Partikel derselben Substanz. So deuten viele Ergebnisse darauf hin, dass die Größe der Partikeloberfläche wichtiger ist als deren chemische Zusammensetzung. Größere Oberflächen zeigen gesteigerte chemische Reaktivität, und scheinen einfacher in die Zelle aufgenommen zu werden. Bei Flugasche wurde gezeigt, dass das unter physiologischen Bedingungen mobilisierbare Eisen vor allem in der Feinpartikel-Fraktion $< 2,5 \mu\text{m}$ enthalten war (SMITH et al., 1998; LAM et al., 2004).

Eine Untersuchung (Inhalationsversuch von Stäuben an Ratten) der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) belegte, dass die kleinsten Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 0,01 - 0,03 μm (GBS-UF) 2½-mal stärker kanzerogen wirkten als etwas größere Partikel (mittlerer Durchmesser 0,09 - 0,2 μm GBS-F) und 8-mal stärker als die größten getesteten Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 1,8 - 4 μm (GBS-F) [UF = Ultrafeinstäube, F = Feinstäube] (ROLLER, 2008).

Für die Wirkung von Partikeln über ihre Oberflächenbeschaffenheit geben die Ergebnisse von FUBINI et al. (1999) einen Hinweis. In ihrer Studie fanden sie heraus, dass Cristobalit (kristallines Quarz mineralischen Ursprungs) in Mausmakrophagen (J774) praktisch inert reagiert, wenn es zuvor auf 1300°C erhitzt wurde, wodurch sich vermutlich die Oberfläche der Partikel verändert und damit ihre biologische Aktivität. Unbehandeltes Cristobalit reagierte in Ratten-Alveolarepithelzellen (AE6) zytotoxisch, und auf 800°C abgekühltes Cristobalit zeigte eine verminderte Zytotoxizität. Die beobachteten Effekte werden vermutlich durch die fehlenden Oberflächenradikale und die entstandenen hydrophoben Eigenschaften (unbehandeltes Cristobalit ist hydrophil) hervorgerufen.

Ob und wie Partikel in die Zellen aufgenommen werden, untersuchte auch eine Studie zur Aufnahme von Polystyrenpartikeln. Hier konnten keine Partikel zwischen den Epithelzellen nach einer Exposition gefunden werden, was darauf hinweist, dass keine Aufnahme der Partikel durch die Tight Junctions stattfindet. Nach einer Exposition von 4 Stunden lagen die meisten Partikel auf der Oberfläche von Atemwegsmakrophagen, manche innerhalb der Makrophagen und wenige auf der Oberfläche der Dendritischen Zellen. Nach 24-stündiger Exposition fand man fast alle Partikel in den Atemwegsmakrophagen und den Dendritischen Zellen. Nur wenige Partikel wurden in den Epithelzellen gefunden (ROTHEN-RUTISHAUSER et al., 2005).

BROWN (1999) wies die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Stäube nach, welcher zur Transkription von Genen für pro-inflammatorische Mediatoren und Proteinbiosynthesen führt.

Alveolarmakrophagen von Ratten antworten auf eine Exposition mit Stäuben oder Lipopolysacchariden mit einer Freisetzung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (DRISCOLL et al., 1997) oder mit der Freisetzung von NO, dem Reaktionsprodukt der induzierbaren NO Synthase (BLACKFORD et al., 1997). TNF- α spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und bewirkt in anderen Zellen die Freisetzung weiterer Zytokine. In Epithelzellen der Lunge wird durch TNF- α die Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 induziert

(STEERENBERG et al., 1998), die unterschiedliche jedoch gleichermaßen wichtige Rollen bei der Entzündung spielen. IL-6 induziert u.a. die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in der Leber, und IL-8 (Klasse der Chemokine) ist mitverantwortlich für die Einwanderung von Entzündungsquellen aus dem umliegenden Gewebe. TNF- α kann auch die Expression von Oberflächenproteinen auf Epithel- und Endothelzellen induzieren, wie z.B. intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1).

Die Zytokinkaskaden, die bei der interzellulären Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt sind, können am besten studiert werden, wenn die Zellen, die im realen Organ benachbart sind, auch im *in vitro* Test möglichst nahe beieinander sind, z.B. in einem Kokultursystem. In einigen Studien zur Wirkung von Schadgasen hat sich gezeigt, dass Kokultursysteme aus Bronchialepithelzellen und Endothelzellen wesentlich empfindlicher, z.B. mit einer erhöhten Zytokinbildung reagieren, als in Kulturen einzelner separater Zelltypen (MÖGEL et al., 1998).

Feinstaub (PM = Particulate matter) induziert in Typ II Lungenepithelzellen von Ratten Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) und steigert die Bildung von 8-hydroxydeoxyguanosin Läsionen (8-OHdG, DNA-Addukt) durch einen Eisen (Fe) vermittelten Reaktionsweg (GILMOUR et al., 1996; KNAAPEN et al., 2000). Die Hydroxylradikale, die aus der Fenton-Reaktion stammen und deren Bildung H_2O_2 abhängig ist, sind in der Lage, das Guanin zu hydroxylieren, wenn die nackte DNA den Partikeln ausgesetzt wird. Typ II Zellen bilden intrazellulär H_2O_2 , evtl. durch eine Aktivierung von NADPH ähnlichen membrangebundenen Enzymen, vermittelt durch eine Protein Kinase C (KINNULA et al., 1991; VAN KLAVEREN et al., 1997; PIOTROWSKI et al., 2000). Die Konzentration von H_2O_2 in A549 Zellen steigt dramatisch nach der Exposition mit dem Übergangsmetall Chrom (YE et al., 1999). Selbst mikromolare Konzentrationen an H_2O_2 in A549 steigern die azelluläre $\cdot\text{OH}$ -Bildung durch Feinstaub. Feinstaub steigert also die entzündungsverstärkende, zelluläre H_2O_2 Abgabe der Neutrophilen (REPINE et al., 1997).

Auch induziert Feinstaub DNA-Strangbrüche in humanen Typ II Zellen (A549). In *in vivo* Studien induziert Feinstaub einen Einstrom von entzündlichen Phagozyten in die Lunge nach Ausschüttung von Zytokinen von Typ II Zellen und/oder Alveolären Makrophagen (LI et al., 1997; JIMINEZ, 2000; SHUKLA et al., 2000).

Um DNA Schäden zu verursachen, müssen $\cdot\text{OH}$ -Radikale im Nukleus, in der Nähe der DNA gebildet werden. Dafür müssen H_2O_2 und Übergangsmetalle im Nukleus vorhanden sein. Das H_2O_2 in Epithelzellen kann auch von extrazellulären Quellen kommen, so wie von

Entzündungszellen (inflammatory cells) oder aus endogenen Quellen. Endogen kann H_2O_2 durch eine Partikel vermittelte Steigerung der NADPH-Oxidase Aktivität entstehen. Auch kann es aufgrund intrazellulärer Sauerstoffreduzierung durch die Oberflächenradikale der Partikel entstehen. Die Diffusion von Eisen und anderen löslichen Übergangsmetallen, welche im Überfluss von den Feinstaubpartikeln erhältlich sind, sorgt für optimale Bedingungen einer Fenton-Reaktion vermittelten, gesteigerten Bildung von $\cdot\text{OH}$ -Radikalen im Nukleus (KNAAPEN et al., 2000).

Somit können die in dieser Arbeit gefundenen DNA-Schäden an primären Epithelzellen neben den Inhaltsstoffen des Zementes auch auf die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften (Massenkonzentration, Neigung zur Aggregatbildung, Größe, Oberflächenbeschaffenheit, Fähigkeit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κB , des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), von NO, Induktion von Hydroxylradikalen, Bildung von DNA-Addukten) der Partikel zurückzuführen sein.

5.5 Grenzen der angewandten Methode

Die bei dieser Untersuchung angewendete Methode zur Bestimmung der Zellvitalität (Erythrosin B Test) zeigte, dass zwei Proben (pEC 21 und 22) bereits bei der Ankunft im Untersuchungslabor (Giessen) zytotoxische Werte von 57 % und 68 % aufwiesen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es zum Zeitpunkt des Transportes zu sommerlichen Höchsttemperaturen gekommen war und die Außentemperatur durchschnittlich bei über 30°C lag. Eine mögliche Ursache für die geringe Vitalität der Primärzellen war vielleicht die nicht ausreichende Kühltemperatur im Inneren des Paketes, um die Zellproben ausreichend vor dem großen Stress durch die Hitze zu schützen.

Dass bei 5 % der Proben die Exposition der Zellen mit TiO_2 zu einer verstärkten DNA-Migration führte, könnte mit einer besonderen/individuellen Empfindlichkeit dieser Zellen/Proben gegenüber TiO_2 zusammenhängen.

Nach Abschließender Betrachtung bestätigt sich anhand der Ergebnisse der Verdacht auf den Zusammenhang einer Zementpartikel-induzierten DNA-Schädigung in humanen *ex vivo*-Zellsystemen (primäre Oropharyngeal Mukosazellen).

Da bislang noch keine in vitro-Untersuchungen zum gesundheitsschädlichen Potential von Zementstaub in humanen Primärzellen existieren, und aufgrund der hohen Varianz der individuellen Daten, lassen die in dieser Arbeit detektierten DNA-Schäden noch keine Rückschlüsse auf mögliche gentoxische Eigenschaften zu. Zwar wird der Begriff Gentoxizität nach D'Arcy & Harron 1995 (HAYASHI, 1994) als „jede Art von schädlicher Veränderung im Genmaterial, ohne Rücksicht auf den Mechanismus, durch den die Veränderung herbeigeführt wird“ geprägt, aber die IARC definiert ihn heute nach mehreren positiven Ergebnissen in anerkannten Testsystemen, wie z.B. dem Mikronukleus Test oder dem Ames-Test. Der Comet-Assay alleine liefert vorerst nur einen Hinweis auf mögliche Gentoxizität, welcher aber in weiteren Tests belegt werden sollte.

Die reale Gefahr für Arbeiter, die mit Zementstaub bei dessen Verarbeitung in Kontakt kommen und diesem ausgesetzt sind, ist anhand dieser Untersuchung nur bedingt abzuleiten, da die Ergebnisse nicht ganz der realen Einwirkung von Zementstaub auf Lungen- oder Epithelzellen entsprechen. In der hier zugrunde gelegten Untersuchung wurde der Zementstaub als Lösung in Medium auf die Zellen aufgebracht. Hierdurch wird seine natürliche Alkalität unterdrückt und ist nicht wirksam (pH Wert im Medium ungefähr neutral). Bei einer Aufnahme von Zementpartikeln in die Lunge durch Inhalation wird eine stark basische Reaktion ausgelöst, die zu einem Anstieg des pH Wertes auf den Zellen führen kann (12,5 bis 13). Dies führt in realen Systemen zu einer Irritation der belasteten Mukosa, was auch die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Tabak, PAH's usw. erklären würde (FAIRHURST, 2005; DIETZ et al., 2004).

Die Vorgehensweise hat also Vor- und Nachteile. Durch die Resuspension des Zementes und der anderen Testpartikel in Medium ist zwar eine rasche Analyse möglich und die löslichen und unlöslichen Bestandteile können getrennt untersucht werden. Allerdings können Fehleinschätzungen der Ergebnisse nicht völlig ausgeschlossen werden, da z.B. die Wechselwirkungen der Partikel mit Mediumbestandteilen zu veränderten (unrealistischen) Reaktionen der Zellen führen können.

5.6 Perspektiven

Eine erhebliche Verbesserung, um die realen Verhältnisse in der Lunge mit direktem Kontakt des Aerosols mit den Targetzellen zu simulieren, wäre die Resuspension von Zementstaub in Luft, was aber technisch sehr aufwendig ist (DIABATÉ & WOTTRICH, 2004) und im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht zu bewerkstelligen war.

Um den genauen Wirkmechanismen von Zementpartikeln auf die Spur zu kommen, könnten weitere Versuche durchgeführt werden, in denen man zu den Zementpartikeln EDTA oder NAC auf die zu testenden Zellen gibt. Bleibt eine erhöhte DNA-Migration aus und die OTM-Werte bleiben auf dem Niveau des Mediums und der Negativkontrolle, so wäre zu vermuten, dass durch die Zementpartikel ROS gebildet werden, und diese durch die Radikalfänger abgefangen werden, und somit die Reaktion verhindert wird, oder dass Metallionen (als Spurenelemente in Zement enthalten) an der Reaktion beteiligt sind.

Interessant wäre auch herauszufinden, ob bei den verschiedenen Zellproben der Patienten eine individuelle Suszeptibilität zu finden ist. Dies wäre durch einen Versuch zu klären (UDS-Test), in welchem beispielsweise die DNA-Schäden der Zellproben von Tumorpatienten durch Enzyme „repariert“ werden. Eine schlechtere oder längere Reparaturzeit ließe dann auf eine stärkere Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Zementstaub schließen.

Um eine abschließende Aussage über die kanzerogenität von Zementstaub machen zu können, müssten die Stäube im Tierversuch auf ihre Fähigkeit das Risiko zur Tumorbildung zu erhöhen, getestet werden. Zur Klärung der Frage ob Zementstaub genotoxisch ist müssten dosisabhängige Untersuchungen von Zementstaub auf primären Epithelzellen durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

Bauarbeiter sind auf der ganzen Welt bei der Herstellung und Verarbeitung von Zement dessen Staub ausgesetzt. Diese feinen Partikel ($0.1 - 200 \mu\text{m}$) sind in der Lage durch Inhalation in die oberen Atemwege und die Lunge zu gelangen und können hierdurch eine Vielzahl von verschiedenen Symptomen, wie z.B. Pneumopathien, Granulome, Bronchialasthma, Husten, Emphyseme und Fibrosen verursachen. In einer epidemiologischen Fall-Kontroll Studie aus dem Rhein-Neckar-Kreis konnte ein Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Zementpartikeln und Effekten im Bereich der oberen Atemwege mit der Folge von Atemwegsobstruktionen und der Entwicklung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich bei Bauarbeitern nachgewiesen werden. Zudem steigt das Risiko für Larynx-Karzinome von Zementarbeitern mit Tabak- und Alkoholkonsum.

Diese Ergebnisse gaben Anlass, um in der hier durchgeführten Untersuchung Biopsieproben von insgesamt 55 Patienten mit und ohne Larynx-Pharynx-Karzinom hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Belastung mit Zementstaub zu testen. Die Fähigkeit von zwei repräsentativen Zementstäuben ($1 - 2.5 \mu\text{m}$ im Durchmesser) DNA zu schädigen, wurde an humanen primären Oropharyngealmukosazellen mit Hilfe der Einzelzell-Gel-Elektrophorese (Comet Assay) untersucht.

Um die Validität des Testsystems zu demonstrieren wurde das bekannte genotoxische Karzinogen Benzo[a]pyren (B[a]P) als Positivkontrolle, Dörentruher Quarz (DQ 12) als positive Partikelkontrolle und Titandioxid (TiO_2) als negative Partikelkontrolle gewählt. Die Exposition der Biopsieproben mit B[a]P und Quarz führte in allen 55 Fällen zu einem signifikanten Anstieg des DNA Schadens ($P < 0.05$). Die Belastung der primären Zellen mit den Zementstäuben, genannt H1 und G (beide in Konzentrationen von $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), verursachte ebenfalls eine signifikante DNA-Migration, für Zement H1 in 77 % der Proben und für Zement G in 48 % der Proben. Zellproben von Patienten mit und ohne Tumor zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Ausmaß des DNA Schadens.

Die in dieser Untersuchung gefundenen positiven Effekte von Zementstäuben auf humane primäre Mukosazellen lassen darauf schließen, dass diese Eigenschaften besitzen, um DNA zu schädigen.

7. Abstract

All over the world construction workers are exposed to cement dust during the mining of raw materials for cement production, or when using cement in the construction industry. The fine particles (0.01 - 200 μm , mean 1 - 50 μm) enter the upper respiratory tract by inhalation and, depending on the length of occupational exposure, may trigger a range of pathological symptoms and diseases, e.g. pneumopathys, granulomas and cough, as well as other conditions such as chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. A German epidemiological study found a correlation between squamous cell carcinoma of the larynx and exposure to cement dust. Furthermore, the relative risk of cement workers developing carcinoma of the larynx increased with smoking habit. In this context, it was necessary to investigate individual sensitivities of biopsy samples from patients with and without tumours of the oropharynx in respect of DNA damage after cement dust exposure.

In this study DNA damage of two representative cement dusts (1 - 2.5 μm in diameter) was investigated in human primary epithelial oropharyngeal mucosa cells using single cell gel electrophoresis (Comet assay). The validity of the test system was demonstrated by using the known carcinogen and genotoxic agent benzo[a]pyrene (BaP) as a reference, quartz DQ12 as a positive particle control and titanium dioxide (TiO_2) as a negative particle control. In all biopsy samples BaP and quartz led to a significant increase of DNA damage. Exposure of the primary cells in vitro to the cement dusts coded as H1 and G (both at concentrations of 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) causes significant DNA migration ($P < 0.05$) for cement dust H1 in 77 % of the biopsy samples and for cement dust G in 48 %. The extent of genotoxic damage is not significantly different between cells from patients with tumours and controls.

From these results we therefore conclude that the positive outcomes of this study with cement dusts in human primary cells provide evidence for DNA damaging properties.

1) Parts of this thesis will be published in Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis with the title:

Sensitivity to DNA-damage induction by cement dusts in mucosa cells from patients with and without malignant upper respiratory tract tumors

Ollmann AIH, Gminski R, Cong Zhang, Bauer Mario, Tschöp K, Wichmann G, Andreas Dietz A, Ebner W and Mersch-Sundermann V

2) The author of this thesis, A. Ollmann, also contributed to the following publication by preparing the protocol, planning the experimental design and by reading and approval the final manuscript in Environmental Toxicology, Article first published online: 27 AUG 2010; DOI: 10.1002/tox.20643 with the title:

Cement-related particles interact with pro-inflammatory IL-8 chemokine from human primary oropharyngeal mucosa cells and epithelial lung cancer cell line A549.

Bauer M, Gräbsch C, Gminski R, Ollmann A, Borm P, Dietz A, Herbarth O, Wichmann G

8. Anhang

8.1 Einzelwerte der Comet Untersuchung

Tab 11: Einzelwerte der Comet Untersuchung (OTM-Mittelwerte aus drei parallelen Messungen mit Standardabweichung: Titandioxid im Vergleich mit Medium

Probe	Medium	SD	TiO2	SD
pEC 10	0,89	0,25	1,35	0,20
pEC 11	1,34	0,36	0,77	0,17
pEC 12	0,88	0,10	1,67	0,42
pEC 13	0,87	0,17	1,12	0,19
pEC 14	1,06	0,04	0,83	0,27
pEC 15	0,81	0,10	0,98	0,19
pEC 16	0,62	0,05	0,53	0,25
pEC 17	0,55	0,14	0,42	0,08
pEC 18	0,80	0,03	0,98	0,26
pEC 19	0,67	0,14	0,57	0,16
pEC 20	0,72	0,07	0,89	0,15
pEC 21	0,55	0,08	0,92	0,27
pEC 22	0,73	0,15	0,66	0,3
pEC 23	1,17	0,13	0,94	0,05
pEC 24	0,71	0,22	2,81	0,15
pEC 25	0,91	0,17	1,00	0,21
pEC 26	1,07	0,23	0,43	0,09
pEC 27	0,73	0,08	0,55	0,01
pEC 28	0,90	0,07	0,61	0,17
pEC 29	0,60	0,1	0,62	0,17
pEC 30	0,75	0,13	0,90	0,12
pEC 31	1,20	0,11	1,18	0,06
pEC 32	0,73	0,01	0,75	0,05
pEC 33	0,41	0,04	0,55	0,03
pEC 34	0,57	0,21	0,64	0,11
pEC 35	1,16	0,17	0,70	0,04
pEC 36	0,96	0,09	0,99	0,07

Probe	Medium	SD	TiO2	SD
pEC 37	0,47	0,14	0,70	0,03
pEC 38	0,49	0,05	0,62	0,11
pEC 39	0,45	0,15	0,58	0,18
pEC 40	0,38	0,08	1,04	0,31
pEC 41	0,61	0,15	0,50	0,07
pEC 42	0,53	0,11	0,65	0,25
pEC 43	0,36	0,07	0,34	0,06
pEC 44	0,58	0,06	0,28	0,06
pEC 45	0,44	0,21	0,42	0,29
pEC 46	0,32	0,15	1,37	0,04
pEC 47	0,68	0,09	0,54	0,05
pEC 48	0,5	0,09	0,53	0,08
pEC 49	0,48	0,05	0,59	0,07
pEC 50	0,42	0,07	0,57	0,13
pEC 51	0,6	0,02	0,9	0,02
pEC 52	0,61	0,03	0,48	0,08
pEC 53	0,56	0,05	0,54	0,08
pEC 54	0,7	0,1	0,7	0,17
pEC 55	0,58	0,13	0,42	0,08
pEC 56	0,76	0,19	1,41	0,12
pEC 57	0,4	0,08	0,6	0,12
pEC 58	0,39	0,09	0,39	0,09
pEC 59	0,54	0,05	1,3	0,1
pEC 60	0,55	0,1	0,74	0,06
pEC 61	0,55	0,1	0,67	0,04
pEC 62	0,69	0,05	0,43	0,05
pEC 63	0,53	0,1	0,77	0,07
pEC 64	0,37	0,1	0,29	0,08

Tab 12: Einzelwerte der Comet Untersuchung (OTM-Mittelwerte aus drei parallelen Messungen mit Standardabweichung: Zement H1 im Vergleich mit Medium

Probe	Medium	SD	Zement H1	SD
pEC 10	0,89	0,25	1,35	0,05
pEC 11	1,34	0,36	2,36	0,28
pEC 12	0,88	0,10	1,59	0,37
pEC 13	0,87	0,17	1,22	0,02
pEC 14	0,63	0,04	2,12	0,35
pEC 15	0,81	0,1	2,28	0,44
pEC 16	0,62	0,05	1,25	0,11
pEC 17	0,55	0,14	1,09	0,37
pEC 18	0,8	0,03	1,07	0,13
pEC 19	0,67	0,14	1,34	0,31
pEC 20	0,72	0,07	0,98	0,13
pEC 21	0,55	0,08	2,06	0,19
pEC 22	0,73	0,15	1,21	0,31
pEC 23	1,17	0,13	1,91	0,34
pEC 24	0,71	0,22	1,96	0,6
pEC 25	0,91	0,17	1,84	0,2
pEC 26	1,07	0,23	1,89	0,36
pEC 27	0,73	0,08	1,92	0,23
pEC 28	0,9	0,07	2,37	0,34
pEC 29	0,60	0,10	1,59	0,2
pEC 30	0,75	0,13	0,82	0,08
pEC 31	1,20	0,11	1,26	0,15
pEC 32	0,73	0,01	1,66	0,23
pEC 33	0,41	0,04	1,69	0,19
pEC 34	0,57	0,21	1,57	0,06
pEC 35	1,16	0,17	1,85	0,09
pEC 36	0,96	0,09	1,41	0,14
pEC 37	0,47	0,14	1,15	0,21

Probe	Medium	SD	Zement H1	SD
pEC 38	0,49	0,05	0,87	0,15
pEC 39	0,45	0,15	3,12	0,25
pEC 40	0,38	0,08	2,84	0,47
pEC 41	0,61	0,15	0,88	0,11
pEC 42	0,53	0,11	1,22	0,15
pEC 43	0,36	0,07	0,45	0,03
pEC 44	0,58	0,06	1,86	0,24
pEC 45	0,44	0,21	2,26	0,34
pEC 46	0,32	0,15	2,04	0,23
pEC 47	0,68	0,09	0,95	0,17
pEC 48	0,50	0,09	1,91	0,21
pEC 49	0,48	0,05	2,69	0,36
pEC 50	0,42	0,07	0,46	0,13
pEC 51	0,60	0,02	1,09	0,18
pEC 52	0,61	0,03	1,52	0,13
pEC 53	0,56	0,05	1,09	0,15
pEC 54	0,70	0,10	1,69	0,17
pEC 55	0,58	0,13	0,68	0,13
pEC 56	0,76	0,19	1,68	0,06
pEC 57	0,40	0,08	0,61	0,17
pEC 58	0,39	0,09	1,19	0,10
pEC 59	0,54	0,05	1,59	0,06
pEC 60	0,55	0,10	1,15	0,16
pEC 61	0,55	0,10	1,15	0,16
pEC 62	0,69	0,05	1,62	0,10
pEC 63	0,53	0,10	0,82	0,09
pEC 64	0,37	0,10	0,40	0,05

Tab 13: Einzelwerte der Comet Untersuchung (OTM-Mittelwerte aus drei parallelen Messungen mit Standardabweichung: Zement G im Vergleich mit Medium

Probe	Medium	SD	Zement G	SD
pEC 10	0,89	0,25	1,26	0,3
pEC 11	1,34	0,36	1,52	0,2
pEC 12	0,88	0,10	1,44	0,35
pEC 13	0,87	0,17	0,99	0,2
pEC 14	0,63	0,04	1,29	0,34
pEC 15	0,81	0,1	1,30	0,2
pEC 16	0,62	0,05	1,12	0,32
pEC 17	0,55	0,14	1,38	0,53
pEC 18	0,8	0,03	2,09	0,35
pEC 19	0,67	0,14	0,96	0,08
pEC 20	0,72	0,07	1,31	0,19
pEC 21	0,55	0,08	1,25	0,04
pEC 22	0,73	0,15	0,97	0,3
pEC 23	1,17	0,13	1,04	0,02
pEC 24	0,71	0,22	1,90	0,54
pEC 25	0,91	0,17	1,11	0,26
pEC 26	1,07	0,23	1,35	0,13
pEC 27	0,73	0,08	0,93	0,2
pEC 28	0,9	0,07	1,75	0,14
pEC 29	0,60	0,10	0,86	0,24
pEC 30	0,75	0,13	0,91	0,12
pEC 31	1,20	0,11	1,02	0,07
pEC 32	0,73	0,01	1,43	0,25
pEC 33	0,41	0,04	1,12	0,07
pEC 34	0,57	0,21	1,31	0,2
pEC 35	1,16	0,17	1,21	0,11
pEC 36	0,96	0,09	0,98	0,08
pEC 37	0,47	0,14	0,85	0,25

Probe	Medium	SD	Zement G	SD
pEC 38	0,49	0,05	0,88	0,15
pEC 39	0,45	0,15	1,97	0,10
pEC 40	0,38	0,08	0,90	0,17
pEC 41	0,61	0,15	0,53	0,2
pEC 42	0,53	0,11	0,94	0,16
pEC 43	0,36	0,07	0,84	0,08
pEC 44	0,58	0,06	0,78	0,09
pEC 45	0,44	0,21	2,14	0,39
pEC 46	0,32	0,15	0,45	0,15
pEC 47	0,68	0,09	1,3	0,16
pEC 48	0,5	0,09	1,05	0,17
pEC 49	0,48	0,05	0,84	0,24
pEC 50	0,42	0,07	0,38	0,05
pEC 51	0,6	0,02	0,57	0,18
pEC 52	0,61	0,03	0,80	0,13
pEC 53	0,56	0,05	1,03	0,16
pEC 54	0,7	0,1	1,94	0,14
pEC 55	0,58	0,13	0,51	0,07
pEC 56	0,76	0,19	0,83	0,07
pEC 57	0,4	0,08	0,40	0,15
pEC 58	0,39	0,09	0,80	0,15
pEC 59	0,54	0,05	1,26	0,07
pEC 60	0,55	0,1	0,67	0,09
pEC 61	0,55	0,1	1,03	0,15
pEC 62	0,69	0,05	1,69	0,13
pEC 63	0,53	0,1	0,71	0,11
pEC 64	0,37	0,1	0,19	0,01

Tab 14: Einzelwerte der Comet Untersuchung (OTM-Mittelwerte aus drei parallelen Messungen mit Standardabweichung: Quarz im Vergleich mit Medium

Probe	Medium	SD	Quarz	SD
pEc 10	0,89	0,25	2,65	0,06
pEC 11	1,34	0,36	3,05	0,66
pEC 12	0,88	0,10	3,22	0,53
pEC 13	0,87	0,17	1,36	0,25
pEC 14	0,63	0,04	1,38	0,21
pEC 15	0,81	0,1	2,14	0,07
pEC 16	0,62	0,05	1,66	0,17
pEC 17	0,55	0,14	1,85	0,12
pEC 18	0,8	0,03	3,05	0,53
pEC 19	0,67	0,14	1,44	0,17
pEC 20	0,72	0,07	2,20	0,5
pEC 21	0,55	0,08	4,37	0,66
pEC 22	0,73	0,15	4,33	0,31
pEC 23	1,17	0,13	1,92	0,29
pEC 24	0,71	0,22	3,91	0,75
pEC 25	0,91	0,17	3,13	0,05
pEC 26	1,07	0,23	1,97	0,18
pEC 27	0,73	0,08	1,80	0,19
pEC 28	0,9	0,07	3,67	0,61
pEC 29	0,60	0,10	2,50	0,10
pEC 30	0,75	0,13	2,36	0,22
pEC 31	1,20	0,11	1,67	0,16
pEC 32	0,73	0,01	2,32	0,18
pEC 33	0,41	0,04	1,70	0,08
pEC 34	0,57	0,21	2,70	0,30
pEC 35	1,16	0,17	1,84	0,12
pEC 36	0,96	0,09	1,67	0,23
pEC 37	0,47	0,14	1,11	0,19

Probe	Medium	SD	Quarz	SD
pEC 38	0,49	0,05	1,02	0,19
pEC 39	0,45	0,15	2,00	0,17
pEC 40	0,38	0,08	1,62	0,32
pEC 41	0,61	0,15	1,2	0,11
pEC 42	0,53	0,11	2,21	0,16
pEC 43	0,36	0,07	1,34	0,23
pEC 44	0,58	0,06	2,39	0,33
pEC 45	0,44	0,21	3,5	0,28
pEC 46	0,32	0,15	1,85	0,21
pEC 47	0,68	0,09	1,64	0,21
pEC 48	0,5	0,09	4,61	0,36
pEC 49	0,48	0,05	2,62	0,42
pEC 50	0,42	0,07	1,27	0,15
pEC 51	0,6	0,02	1,75	0,36
pEC 52	0,61	0,03	2,91	0,15
pEC 53	0,56	0,05	1,84	0,26
pEC 54	0,7	0,1	2,65	0,20
pEC 55	0,58	0,13	2,30	0,14
pEC 56	0,76	0,19	2,24	0,12
pEC 57	0,4	0,08	2,65	0,16
pEC 58	0,39	0,09	2,56	0,15
pEC 59	0,54	0,05	2,46	0,08
pEC 60	0,55	0,1	2,30	0,07
pEC 61	0,55	0,1	3,32	0,23
pEC 62	0,69	0,05	3,53	0,25
pEC 63	0,53	0,1	1,70	0,15
pEC 64	0,37	0,1	1,25	0,13

Tab 15: Einzelwerte der Comet Untersuchung (OTM-Mittelwerte aus drei parallelen Messungen mit Standardabweichung: Zement G im Vergleich mit Medium

Probe	Medium	SD	B[a]P	SD
pEc 10	0,89	0,25	2,35	0,11
pEC 11	1,34	0,36	4,42	0,55
pEC 12	0,88	0,10	5,85	1,04
pEC 13	0,87	0,17	3,13	0,4
pEC 14	0,63	0,04	3,73	0,72
pEC 15	0,81	0,1	3,10	0,41
pEC 16	0,62	0,05	1,28	0,05
pEC 17	0,55	0,14	3,15	0,29
pEC 18	0,8	0,03	4,32	0,59
pEC 19	0,67	0,14	2,47	0,18
pEC 20	0,72	0,07	2,89	0,21
pEC 21	0,55	0,08	3,79	0,46
pEC 22	0,73	0,15	5,65	0,1
pEC 23	1,17	0,13	3,17	0,58
pEC 24	0,71	0,22	7,75	1,01
pEC 25	0,91	0,17	4,71	0,36
pEC 26	1,07	0,23	4,37	0,63
pEC 27	0,73	0,08	1,91	0,32
pEC 28	0,9	0,07	4,36	0,47
pEC 29	0,60	0,10	3,21	0,10
pEC 30	0,75	0,13	1,86	0,18
pEC 31	1,20	0,11	1,99	0,12
pEC 32	0,73	0,01	5,17	0,71
pEC 33	0,41	0,04	3,23	0,23
pEC 34	0,57	0,21	3,28	0,24
pEC 35	1,16	0,17	2,08	0,31
pEC 36	0,96	0,09	1,18	0,16
pEC 37	0,47	0,14	3,64	0,39

Probe	Medium	SD	B[a]P	SD
pEC 38	0,49	0,05	1,84	0,16
pEC 39	0,45	0,15	3,75	0,30
pEC 40	0,38	0,08	5,06	0,50
pEC 41	0,61	0,15	1,77	0,2
pEC 42	0,53	0,11	4,8	0,57
pEC 43	0,36	0,07	1,59	0,35
pEC 44	0,58	0,06	2,2	0,3
pEC 45	0,44	0,21	5,17	0,22
pEC 46	0,32	0,15	2,86	0,34
pEC 47	0,68	0,09	2,42	0,19
pEC 48	0,5	0,09	4,52	0,32
pEC 49	0,48	0,05	4,19	0,31
pEC 50	0,42	0,07	1,50	0,16
pEC 51	0,6	0,02	3,96	0,48
pEC 52	0,61	0,03	2,82	0,12
pEC 53	0,56	0,05	2,75	0,22
pEC 54	0,7	0,1	3,10	0,15
pEC 55	0,58	0,13	2,92	0,32
pEC 56	0,76	0,19	2,91	0,03
pEC 57	0,4	0,08	4,72	0,54
pEC 58	0,39	0,09	4,16	0,29
pEC 59	0,54	0,05	2,40	0,14
pEC 60	0,55	0,1	3,40	0,12
pEC 61	0,55	0,1	3,64	0,25
pEC 62	0,69	0,05	4,11	0,13
pEC 63	0,53	0,1	1,97	0,15
pEC 64	0,37	0,1	1,38	0,07

8.2 Induktionsfaktoren der DNA-Migration in pEC durch die Prüfsubstanzen im Vergleich zur Mediumkontrolle

Tab.:16: Induktionsfaktoren der Prüfsubstanzen im Vergleich zur Mediumkontrolle pEC 10 -64.
Farblich unterlegt = Minimum (orange) und Maximum (grün).

pEC	Ratio OTM TiO ₂ /Medium	Ratio OTM Zement H1 /Medium	Ratio OTM Zement G /Medium	Ratio OTM Quarz/Medium	Ratio OTM B[a]P/Medium
10	1,52	1,52	1,42	2,99	2,65
11	0,58	1,76	1,13	2,28	3,30
12	1,91	1,81	1,64	3,67	6,66
13	1,28	1,40	1,14	1,93	3,59
14	0,78	2,00	1,28	1,30	3,52
15	1,22	2,57	1,60	2,65	3,84
16	0,86	2,03	1,98	2,70	2,07
17	0,77	1,99	2,54	3,39	5,78
18	1,23	1,35	2,63	3,83	5,43
19	0,85	2,00	1,43	2,15	3,67
20	1,24	1,36	1,82	3,06	4,02
21	1,67	3,72	2,26	7,90	6,85
22	0,90	1,65	1,33	5,93	7,74
23	0,80	1,63	0,88	1,64	2,71
24	3,94	2,74	2,67	5,49	10,88
25	1,10	2,02	1,22	3,44	5,17
26	0,40	1,78	1,27	1,85	4,10
27	0,75	2,61	1,26	2,45	2,60
28	0,68	2,63	1,94	4,06	4,84
29	1,03	2,65	1,44	4,18	5,35
30	1,20	1,09	1,21	3,13	2,47
31	0,98	1,05	0,85	1,39	1,65
32	1,03	2,28	1,96	3,18	7,09
33	1,35	4,14	2,75	4,17	7,94
34	1,12	2,76	2,29	4,73	5,75
35	0,60	1,60	1,04	1,59	1,80
36	1,03	1,47	1,02	1,74	1,23
37	1,49	2,45	1,81	2,37	7,73
38	1,26	1,77	1,78	2,07	3,73
39	1,29	6,91	4,38	4,43	8,32
40	2,71	7,44	2,37	4,26	13,27
41	0,82	1,44	0,87	1,97	2,90
42	1,23	2,30	1,77	4,17	9,06
43	0,34	1,25	2,33	3,72	4,42
44	0,48	3,21	1,34	4,12	3,79
45	0,95	5,14	4,86	7,95	11,75
46	4,28	6,38	1,41	5,78	8,94
47	0,79	1,40	1,91	2,41	3,56
48	1,06	3,82	2,10	0,55	9,04
49	1,23	5,60	1,75	0,31	8,72
50	1,36	1,10	0,90	0,82	3,58
51	1,50	1,82	0,94	0,52	6,60
52	0,79	2,49	1,31	0,53	4,62

53	0,96	1,95	1,85	0,95	4,92
54	1,00	2,41	2,77	1,15	4,43
55	0,72	1,17	0,88	0,75	5,04
56	1,86	2,21	1,10	0,49	3,83
57	1,50	1,51	1,01	0,67	11,79
58	1,00	3,04	2,05	0,68	10,68
59	2,41	2,94	2,34	0,80	4,44
60	1,35	2,08	1,22	0,58	6,17
61	1,22	2,08	1,87	0,90	6,62
62	0,62	2,34	2,45	1,05	5,95
63	1,45	1,54	1,34	0,87	3,72
64	0,78	1,08	0,52	0,48	3,72

8.3 Literaturübersicht über Effekte von Zementstaub

Um einen Überblick über bereits vorliegende Forschungsarbeiten zu geben, hier eine tabellarische Auflistung von Arbeiten, die nachweislich negative gesundheitliche Effekte von Zementstaub auf Arbeiter in der Zementindustrie oder in Tiermodellen gefunden haben.

Tab.17: Forschungsarbeiten, in denen nachweislich negative gesundheitliche Effekte von Zementstaub gefunden wurden, und deren Autoren

Negative gesundheitliche Effekte von Zementstaub	Autoren
Erhöhtes Risiko für Maligne Neoplasien, Lungenkrebs, Blasenkrebs, Magenkrebs	SMAILYTE, 2004
Erhöhtes Risiko für Larynx- Pharynx-tumore	MAIER, 1990, 1991, 1992, 1994, 1997, 1999
Atrophische und hypertrophische Veränderungen in der nasalen und pharyngealen Mukosa und exfoliative Bronchitis, Gewebefibrosen und emphysemische Areale in der Lunge, chronische Rhinitis, Laryngitis und Pharynxkatarrh in den oberen Atemwegen, funktionale Einbußen der Lungenfunktion	MACIEJEWSKA & BIELICHOWSKA-CYBULA, 1991
Intratracheal applizierter Zementstaub (Mäusen und Ratten) mit einem Gehalt an freiem Silica von 1,3 % induzierte experimentell Pneumopathien	EINBRODT et al., 1966
Inhalation von Zementstaub (Ratten) verursachte Abnahme der elastischen Fasern, häufig auch fokales Lungenemphysem	Niepolomski et al., 1967
Langzeitexposition in Zementfabrik verursachte in Lungengewebe zahlreiche histiocytische Granulome, irreguläres, verhärtetes, fibrohyalines Narbengewebe mit vielen Einschlüssen von Zementstaub und bronchiektatische Läsionen	CORTEZ & PEIXOTO, 1978

Röntgenologische Untersuchungen an Arbeitern aus der Zementindustrie zeigten Fälle von Silicosis	PARMEGGIANI, 1951
Bei Arbeitern einer Portlandzementfabrik zeigten sich Mikronodulationen nach 15 jähriger Exposition und konfluente Veränderungen nach 20 jähriger Exposition	PROSPERI & BARSi, 1957
Signifikant niedrigere ventilatorische Lungenfunktion (FEV ₁ /FVC) bei Arbeitern einer Zementfabrik als die einer Kontrollgruppe	KALACIC, 1974
Erhöhte Frequenz an Husten, Schleimproduktion, Atemgeräuschen, Kurzatmigkeit, Sinusitis, Bronchitis und Asthma bei Arbeitern, die Zementstaub ausgesetzt waren (11 – 16 Jahre), niedrigere Werte von Lungenfunktionstests (VC, FVC ₁ , PEF, FEV ₁ /VC, FEV ₁ /FVC) als Kontrollpersonen	ABUDHAISE et al., 1997; AL-NEAIMI et al., 2001
Reduzierte FVC und FEV ₁ Werte, ansteigende FVC/ FEV ₁ Rate, niedrige PEF und MVV Werte	MEO et al., 2002
Akute Effekte bei Arbeitern in Zementfabrik in der Lungenfunktion, reduzierte Werte von FEV ₁ , FEV ₁ /FVC, FEF _{25-75%} nach einer Arbeitsschicht	ALI et al., 1998
Niedrige Werte von FEV ₁	MWAISELAGE et al., 2004
Zusammenhang zwischen COPD und beruflich bedingter Staubbelastung	BECKLAKE, 1989
Chronische Atemwegserkrankungen bei Zementstaub belasteten Arbeitern; Husten, Kurzatmigkeit, laufende Nase	KALACIC, 1974; ABOU-TALEB et al., 1995; MWAISELAGE, 2004
Krankhafte Symptome der Atemwege, Beeinträchtigung der Lungenfunktion, erniedrigte Werte von FEV ₁ % und FEF _{25-75%}	NOOR et al., 2000; ALAKIJA et al., 1990; MENGESHA & BEKELE, 1997; OLERU, 1984
Zementablagerungen und entzündliche Infiltrationen und atrophe und hypertrophische Veränderungen in mukösen Nasalmembranen	JANICKA-BEUT & KORENKIEWICZ, 1997
Signifikant erhöhte Sterblichkeitsrate durch Exposition gegenüber Zementstaub, insbesondere erhöhtes Risiko für Tracheal-, Brochial- oder Lungenkrebs	RAFNSSON & JOHANNESDOTTIR, 1985, 1997; COHEN & POPE, 1995
Erhöhte Rate an Kontaktdermatitis unter Arbeitern einer Zementfabrik	VARIGOS & DUNT, 1981; McDOWALL, 1986
Kardiovaskuläre oder pulmonale Komplikationen durch Feinstäube (Zementstaub)	COHEN & POPE, 1995; DOCKERY et al., 1993
Chronische Verschleimung der Atemwege, Stenoseatmung, röntgenologische Abnormalitäten	ABRONS, 1988, 1997
Erhöhte Cadmiumwerte im Blut	BURHANETTIN et al., 2005

Stenoseatmung, Kurzatmigkeit, Bronchialasthma	BALLAL et al., 2004
Husten, Schleimproduktion, Hautirritationen, Beklemmung, Konjunktivitis, Katarrh, Magenbeschwerden, Furunkel	OLERU, 1984
Rechtsseitiger Colorektalkrebs	JAKOBSSON, 1993
Husten, chronische Bronchitis, Asthma, eingeschränkte ventilatorische Funktion der Lunge	LARAQUI HOSSINI et al., 2002; YANG et al., 1993
Krankhafte Effekte auf die Atemwege	ALVEAR-GALINDO et al., 1999

Als Gegensatz zu den gefundenen Effekten eine Literaturübersicht an Arbeiten, die keine Effekte von Zementstaub nachweisen konnten.

Tab.18: Forschungsarbeiten, in denen keine negativen gesundheitlichen Effekte von Zementstaub gefunden wurden, und deren Autoren.

Keine Effekte	Autoren
Kohlenstoffpartikel werden weder von den Alveolarzellen Typ I noch von den Zellen Typ II aufgenommen	STEARNS et al., 2001
Keine Hinweise auf Lungenfibrose oder Silicosis bei Arbeitern einer Zementfabrik	VACCAREZZA, 1950
Keine Hinweise auf Staublungenkrankheit bei Angestellten aus Zementfabriken	BAZAS et al., 1975
Keine Unterschiede des allgemeinen Zustandes des respiratorischen Systems und der ventilatorischen Lungenfunktion bei Arbeitern in Zementfabrik und Kontrollgruppe	FELL et al., 2003
Keine Unterschiede unter Berücksichtigung des Alters, Gewichts und der Größe von Arbeitern einer Zementfabrik und Kontrollgruppe	RASMUSSEN et al., 1977
Nach Langzeitexposition kein erhöhtes Risiko für Atemwegserkrankungen	VESTBO & RASMUSSEN, 1989, 1991
Kein erhöhtes Risiko für Magenkrebs	AMANDUS, 1986
Kein erhöhtes Risiko für Erkrankungen der Lunge	MCDOWALL, 1984, 1986
Keine Gentoxizität in ovariellen Hamsterzellen im Comet Assay	RIBEIRO et al., 2006

Literaturverzeichnis

- Abderhalden, R., Hofer, H., Jacobs, F., Rast, H. (1999):**
Schutz vor Hautkrankheiten durch Zement
FFB-Cementbulletin März 1999
- Abou-Taleb, A.N., Musaiger, A.O., Abdelmoneim, R.B. (1995):**
Health status of cement workers in the United Arab Emirates
J R Soc Health 115: 378-381
- Abrons, H.L., Petersen, M.R., Sanderson, W.T., Engelberg, A.L., Harber, P. (1988):**
Symptoms, ventilatory function, and environmental exposures in Portland cement workers
Br J Ind Med 45: 368-375
- Abrons, H.L., Petersen, M.R., Sanderson, W.T., Engelberg, A.L., Harber, P. (1997):**
Chest Radiography in Portland Cement Workers
J of Occup & Envir Med 39: 1047-1054
- Abudhaise, B.A., Rabi, A.Z., al Zwairy, M.A., el Hader, A.F., el Qaderi, S. (1997):**
Pulmonary manifestations in cement workers in Jordan
Int J occup Med Environ Health 10: 417-428
- Ahrens, W., Jöckel, K.H., Patzak, W., Elsner, G. (1991):**
Alcohol, smoking, and occupational factors in cancer of the larynx: a case-control study
Am J Ind Med 20: 477-493
- Alakija, W., Iyawe, V.I., Jarikre, L.N., Chiwuzie, J.C. (1990):**
Ventilatory function of workers at Okpella cement factory in Nigeria
West Africa J of Med 9: 187-192
- Ali, B.A., Ballal, S.G., Albar, A.A., Ahmed, H.O. (1998):**
Post-shift changes in pulmonary function in a cement factory in eastern Saudi Arabia
Occup med 48: 519-522
- Al-Neaimi, Y.I., Gomes, J., Lloyd, O.L. (2001):**
Respiratory illnesses and ventilatory function among workers at a cement factory in a rapidly developing country
Occup Med 51: 367-373
- Alvear-Galindo, M.G., Mendez-Ramirez, I., Villegas-Rodríguez, J.A., Chapela-Mendoza, R., Eslava-Camos, C.A., Laurel, A.C. (1999):**
Risk Indicator of Dust Exposure and health Effects in Cement Plant Workers
J of Occup & Envir Med 41: 654-661

Amandus, H.E. (1986):

Mortality from stomach cancer in United States cement plant and quarry workers, 1950-80
Brit J Indust Med 43: 526-528

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (1992):

The threshold limit values for chemical substances and physical agents in the work environment and biological exposure indices
Cincinnati.OH (USA): American Conference of Governmental Industrial Hygienists

Ambrosius, G. (2000):

Das Zementekzem – eine vermeidbare Berufskrankheit.
Die Industrie der Steine und Erden, 2/00

Amtsblatt der Europäischen Union (2003):

Richtlinie 2003/53/EG des Europäischen Parlaments und des Rates

Baeza-Squiban, A., Boisvieux-Ulrich, E., Guilianelli, C., Houcine, O., Geraud, G., Guennou, C., Marano, F. (1994):

Extracellular matrix-dependent differentiation of rabbit tracheal epithelial cells in primary culture.
In Vitro Cell Dev Biol Anim 30A: 56 – 67

Balaan, M., Weber, S., Banks, D. (1993):

Clinical aspects of coal worker's pneumoconiosis and silicosis
Occup Med: State of the Art Rev 8: 19-34

Ballal, S.G., Ahmed, H.O., Ali, B.A., Albar, A.A., Alhasan, A.Y. (2004):

Pulmonary effects of occupational exposure to Portland cement: a study from eastern Saudi Arabia
Int J Occup Environ Health 10: 272-277

Banks, D., Bauer, M., Castellan, R. (1983):

Silicosis in surface coalmine drillers
Thorax 38: 275-278

Baroutian, S., Mohebbi, A., Soltani Goharrizi, A. (2006):

Measuring and modelling particulate dispersion: A case study of Kerman Cement Plant
J of Hazardous Materials 136: 468-474

Bazas, B., Kanellopoulos, G., Sarivalassis, M. (1975):

The effect of the long term inhalation of cement dust on the respiratory system of cement workers in Greece
Eighteenth International Congress on Occupational Health, Brighton, England, 14-19, Abstracts, 15

Bazas, T. (1980):

Effects of Occupational Exposure to Dust on the Respiratory System of Cement Workers
J Soc Occup Med 30: 31-36

Becher, H., Dietz, A. (2002):

Epidemiologische Fall-Kontroll-Studie mit molekulargenetischen bzw. oxikologischen Zusatzuntersuchungen zur Ätiologie des Larynxkarzinoms
Deutsches Krebsforschungszentrum, Universität Heidelberg

Becher, H., Ramroth, H., Schmezer, P., Rajaei-Behbahani, N., Dietz, A. (2001):

Gene-Environment interaction between Poly(ADP-ribose)polymerase activity, smoking and alcohol: a case-control study on laryngeal cancer
Genetic Epidemiology 21: 142

Becker, N., Wahrendorf, J. (1998):

Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland
3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

Becklake, M.R. (1989):

Occupational exposures: evidence for a causal association with chronic obstructive pulmonary disease
Am Rev Respir Dis 140: 85-91

Becklake, M. (1994):

Pneumoconiosis
In: Murray, J.; Nadel, J. (Hrsg.) Textbook of Respiratory Medicine, 2nd edition, W.B. Saunders, 1955-1966.

Begin, R.O., Cantin, A.M., Boileau, R.D., Bisson, B.Y. (1987):

Spectrum of alveolitis in quartz-exposed human subjects
Chest 92: 1061-1067

Berger, J., Chang-Claude, J., Möhner, M., Wichmann, H.-E. (1996):

Larynxkarzinom und Asbestexposition: Eine Bewertung aus epidemiologischer Sicht
Zbl Arbeitsmed 46: 166-186

Bernard, B.K., Osheroff, M.R., Hofmann, A., Mennear, J.H. (1990):

Toxicology and carcinogenesis studies of dietary titanium dioxide-coated mica in male and female Fischer 344 rats
J Toxicol Environ Health 29: 417-429

Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit (2001):

Jahresbericht 2001
Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, Sankt Augustin

Blackford, J.A.Jr, Jones, W., Dey, R.K., Castranova, V. (1997):

Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats

J Toxicol Environ Health 51: 203-218

Brown, L.M., Mason, T.J., Picle, L.W., Stewart, P.A., Buffler, P.A., Burau, K., Ziegler, R.G., Fraumeni, J.F. Jr (1982):

Occupational risk factors for laryngeal cancer on the Texas Gulf Coast

Cancer Re 48: 1960-1964

Brown, D.M., Beswick, P.H., Donaldson, K. (1999):

Induction of nuclear translocation of NK- κ B in epithelial cells by respirable mineral fibres

J Pathol 189: 258-264

Brugere, J., Guenel, P., Lecler, A.,Rodriguez, J. (1986):

Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth

Cancer 57: 391-395

Burhanettin, I., Temir, A.D., Tamer, A., Asiye, B., Selim, M.Ü., Cemalettin, K., Mediha, C. (2006):

Cadmium exposure from the cement dust emissions: A field study in a rural residence

Chemosphere Vol 63, *Iss* 9: 1546-1552

Cakmak, G.D., Schins, R.P., Shi, T., Fenoglio, I., Fubini, B., Borm, P.J., (2004):

In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ 12 quartz

In J Hyg Environ Health 207: 105-113

Cauvin, J.M., Guenel, P., Luce, D., Brugere, J., Leclerc (1990):

Occupational exposure and head and neck carcinoma

Clin Otolaryngol 15: 439-445

Chandra, A.K., Ghosh, R., Chatterjee, A., Sarkar, M. (2007):

Effects of vanadate on male rat reproductive tract histology, oxidative stress markers and androgenic enzyme activities

Journal of Inorganic Chemistry 101: 944-956

Chen, W., Chen, J. (2002):

Nested case-control study of lung cancer in four Chinese tin mines

Occup Environ Med 59: 113-118

Chen, J.L., Fayerweather, W.E. (1988):

Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide

J Oxxup Med 30: 937-942

Cloos, J., Spitz, M.R., Schatz, S.P. (1996):

Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma
Journal of the National Cancer Institute 88: 520-535

Cohen, A.J., Pope III, C.A. (1995):

Lung Cancer and Air pollution
Environ Health Perspect 103: 219-224

Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R. (1997):

The comet assay: what can it really tell us?
Mut Res 375: 183-193

Cortez, P.J., Peixoto, M. A. (1978):

Pulmonary and hepatic granulomatous disorders due to the inhalation of cement and mica dusts
Thorax 33: 219

Davies, J.M. (1984):

Lung cancer mortality among workers making lead chromate and zinc chromate pigments at three English factories
Br J Ind Med 41: 158-169

DFG-Deutsche Forschungsgesellschaft (1999):

Siliciumdioxid, kristallin, Quarz-, Cristobalit-, Tridynamitstaub (alveolengängiger Anteil)
Greim H(ed) Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe: toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten: 29

Diabaté, S., Wottrich, R. (2004):

Gesundheitseffekte durch inhalierbare Feinststäube aus technischen Verbrennungsanlagen: *In vitro* Untersuchungen zur Wirkung feiner und ultrafeiner Partikel auf kultivierte Lungenzellen. Toxikologie von Feinststäuben
Forschungszentrum Karlsruhe, Zwischenbericht

Dietz, A. (2002):

Kehlkopfkrebs – eine Frage der persönlichen Suszeptibilität
HNO 50: 105-108

Dietz, A., Sennewald, E., Maier, H. (1995):

Indoor air pollution by emissions of fossil fuel-single stoves - possibly a hitherto underrated risk factor in the development of carcinomas in head and neck
Otolaryngology – Head and Neck surgery 2: 308-315

Dietz, A., Ramroth, H., Urban, T., Ahrens, W., Becher, H. (2004):

Exposure to cement dust, related occupational groups and laryngeal cancer risk: results of a population based case-control study.
Int J Cancer 108: 907-911

Dietz, A. (2005):

Zunehmende Differenzierung der Therapie beim fortgeschrittenen Larynx/
Hypopharynx-karzinom
Laryngo-Rhino-Otol 84: 479-481

Dockery, D.W., Schwartz, J., Spengler, J.D. (1992):

Air pollution and daily mortality: associations with particulates and acid aerosols
Environ Res 59: 362-373

Dockery, E.W., Pope, C.A. III, Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Speizer,

F.E. (1993):

An association between air pollution and mortality in six U.S. cities
New Eng J Medicine 329: 1753-1759

Driscoll, K.E., Deyo, L.C., Carter, J.M., Goward, B.W., Hassenbein, D.G., Bertram, T.A. (1997):

Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells
Carcinogenesis 18: 423-430

Einbrodt, H.J., Oberthür, W., Hentschel, D. (1966):

Über den Staubanfall in Zementwerken und deren Umgebung im Hinblick auf mögliche Gesundheitsschäden
Arbeitsmedizin Sozialmedizin Arbeitshygiene 10: 349

Elia, M.C., Storer, R.D., McKelvey, T.W. (1994):

Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoreses and implications for alkaline elution assays
Environ Mo Mutagen 24: 181-191

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995):

The comet assay: a comprehensive review
Mut Res 339: 37-59

Fairhurst S., Phillips A., Gilles C., Brown (1997):

Portland cement dust: criteria document for an occupational exposure limit
J Occup Env Med 47

Fell, A.K., Thomassen, T.R., Kristensen, P., Egeland, T., Kongerud, J. (2003):

Respiratory symptoms and ventilatory function in workers exposed to portland cement dust
J Occup Environ Med 45: 1008-1014

Finkelstein, M. (1994):

Silicosis Surveillance in Ontario: Detection Rates. Modifying Factors and Screening Intervalls
Am J Ind Med 25: 257-266

Fischer Weltalmanach, Verantwortlicher Autor: Paesler, Dr. Reinhard (2007):

Kapitel Wirtschaft

Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt a.M.

Flanders, W.D., Rothman, K.J. (1982):

Occupational risk for laryngeal cancer

Am J Public Health 72: 369-372

Flanders, W.D., Cann, D.I., Rothman, K.J., Fried, M.P. (1984):

Work-related risk factors for laryngeal cancer

Am J Epidemiol 119: 23-32

Forschungsinstitut der Zementindustrie Düsseldorf (1998):

Technische Berichte zu Energie- und Stoffbilanzen von Zementöfen

Fubini, B., Bolis, V., Cavenago, A., Volante, M. (1995):

Physicochemical properties of crystalline silica dusts and their possible implication in various biological responses

Scand J Work Environ Health 21: 9-14

Fubini, B., Zanetti, G., Altília, S., Tiozzo, R., Lison, D., Saffiotti, U. (1999):

Relationship between Surface Properties and Cellular Responses to Crystalline Silica: Studies with Heat-Treated Cristobalite

Chem Res Toxicol 12: 737-745

Geh, S. (2005):

Direkte und indirekte Genotoxizität alveolengängiger Bentonitpartikel in Abhängigkeit ihrer Varietäten in vitro

Diss an der Med Fak Duisburg-Essen

Geh, S., Yücel, R., Duffin, R., Albrecht, C., Borm, P.J.A., Armbruster, L., Raulf-Heimsoth, M.,

Brüning, T., Hoffmann, E., Rettenmeier, A.W., Dopp, E. (2006):

Cellular uptake and cytotoxic potential of respirable bentonite particles with different quartz contents and chemical modifications in human lung fibroblasts

Arch Toxicol 80: 98-106

Gercken, G., Berg, I., Dörger, M., Schlüter, T. (1996):

Mechanisms of particle-induced activation of alveolar macrophages

Toxicol Lett 88: 121-129

Ghio, A., Kennedy, P., Schapira, R., Crurnbliss, A., Hoida, J. (1990):

Hypothesis: is lung disease after silica inhalation caused by oxidant generation

Lancet 336: 967-969

Gilmour, P.S., Brown, D.M., Lindsay, T.G., Beswick, P.H., MacNee, W., Donaldson, K. (1996):

Adverse Health effects of PM10 particles: Involvement of iron in generation of hydroxyl radical

Occup Environ Med 53: 817-822

Gminski, R. Vojnar, B., Stecher, J. , Noak, N., Weigl, J. (2009):

Studies on cytotoxicity and genotoxicity of cement dusts in A 549 epithelial lung cells in vitro

In Vorbereitung

Harréus, U., Kleinsasser, N.H., Zieger, S., Wallner, B., Reiter, M., Schuller, P., Berghaus, A.

(2004):

Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization

Mut Res 563: 131-138

Hart, G.A., Hesterberg, T.W. (1998):

In vitro toxicity of respirable-size particles of diatomaceous earth and crystalline silica compared with asbestos and titanium dioxide

J Occup Environ Med 40: 29-42

Hartung, W., Seong Moon, J. (1992):

Das derzeitige Bild der Anthrako-Silikose, ihrer Komplikationen und Kollisionen mit anderweitigen Erkrankungen

Pneumologie 46: 516-524

Hayashi, M. (1994):

Acceptability of in vivo MN and CA tests. In P.F. D'Arcy and D.W.G. Harron (eds.): Proceedings of the Second International Conference on Harmonisation (ICH 2)

Greystoke Books Ltd., N.Ireland: 232-237

Hessel, P.A., Sluis-Cremer, O.K., Hnizdo, E. (1990):

Silica exposure, silicosis, and lung cancer: a necropsy study

Br J In Med 47: 4-9

Hnizdo, E., Murray, L., Sluis-Cremer, O.K., Thomas, R.O. (1993):

Correlation between radiological and pathological diagnosis of silicosis: An autopsy population based study

Am J Ind Med 24: 427-445

Hornberg, C., Maciuleviciute, L., Seemayer, N.H. (1996):

Sister chromatid exchanges in rodent tracheal epithelium exposed in vitro to environmental pollutants

Toxicol Lett 88: 45-5

Höhne, K. (2006):

Dendritische Zellen in der Tracheobronchialschleimhaut: Tierexperimentelle Untersuchungen an der Ratte und Ergebnisse von menschlichen Proben
Medizinische Hochschule Hannover

IARC (1990, 1997):

Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 49: Chromium, Nickel, Welding
Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 68: Silica, Coal dust, para-Aramid fibrils

Jakobsson, K., Attewell, R., Hultgren, B., Sjöland, K. (1990):

Gastrointestinal cancer among cement workers
Int Arch Occup Environ Health 62: 337-340

Jakobsson, K., Horstmann, V., Welinder, H. (1993):

Mortality and cancer morbidity among cement workers
Br J Ind Med 50: 264-272

Janicka-Beuth, L., Korenkiewicz, J. (1997):

Clinical investigations and cytological examinations of the nose in subject exposed to cement dust
Otolaryngol Pol 51: 133-138

Jimenez, L.S., Thompson, J., Brown, D.A., Rahman, I., Antonicelli, F., Duffin, R., Drost, E.M., Hay, R.T., Donaldson, K., MacNee, E. (2000):

Activation of NFkappaB By PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation
Toxicol Appl Pharmacol 166: 101-110

Kalacic, I. (1973):

Ventilatory lung function in cement workers
Arch Environ Health 26: 84-85

Kalacic, I. (1974):

Early detection of expiratory airflow obstruction in cement workers
Arch Environ Health 29: 147-149

Kinnula, V.L., Everitt, J.I., Whorton, A.R., Crapo, J.D. (1991):

Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells
Am J Physiol 261: L84-L91

Keller J.E., Howe, H.L. (1993):

Cancer in Illinois construction workers: a study
Am J Ind Med 24: 223-230

- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnström, G. (1996):**
The comet assay: mechanisms and technical considerations
Mut Res 363: 89-96
- Kleinsasser, N., Dirschedl, P., Staudenmaier, R., Harreus, U., Wallner, B. (2003):**
Genotoxic effects of vanadium pentoxide on human peripheral lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract
Int J Environ Health Res, 13: 373-379
- Knaapen, A.M., Schins, R.P.F., Steinfartz, Y., Höhr, D., Dunemann, L., Borm, P.J.A. (2000):**
Ambient particulate matter induces oxidative DNA damage in lung epithelial cells
Inhal Toxicol 12: 125-132
- Knaapen, Ad M., Albrecht, C., Becker, A., Höhr, D., Winzer, A., Haenen, G.R., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F. (2002):**
DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation
Carcinogenesis, Vo.23, N.7, 1111-1120
- Knaapen, Ad M., Shi, T., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F. (2002):**
Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter
Molecular and Cellular Biochemistry 234/235: 317-326
- Krstev, S., Baris, D., Stewart, P.A., Hayes, R.B., Blair, A., Dosemeci, M. (1998):**
Risk for prostate cancer by occupation and industry. A 24-state death certificate study
Am J Ind Med 34: 413-420
- Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Hunter, R.L. (2004):**
Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation
Toxicol Sci 77: 126-134
- Lapp, L., Castrano, V. (1993):**
How silicosis and coal worker's pneumoconiosis develop – a cellular assessment
Occup Med: State of the Art Rev 8: 35-56
- Laraqui Hossini, C.H., Laraqui Hossini, O., Rahhali, A.E., Tripodi, D., Caubet, A., Belamallem, I., Verger, C., Hakam, K., Alaoui Yazidi, A. (2002):**
Symptômes respiratoires et troubles ventilateurs chez les travailleurs dans une cimenterie au maroc
Rev Mal Respir 19: 183-189
- Li, X.Y., Gilmour, P.S., Donaldson, K., MacNee, W. (1997):**
In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10)
Environ Health Perspect 105: 1279-1283

Lindl, T. (2002):

Zell- und Gewebekultur.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin

Lindenschmidt, R.C., Driscoll, K.E., Perkins, M.A., Higgins, J.M., Maurer, J.K., Belfiore, K.A.

(1990):

The comparison of a fibrogenic and two nonfibrogenic dusts by bronchoalveolar lavage

Toxicol App Pharmacol 102: 268-281

Linsel, G. (2001):

Bioaerosole – Entstehung und biologische Wirkungen

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Berlin

Maciejewska, A., Bielichowska-Cybula, G. (1991):

Biological effects of cement dust

Med Pr 42: 281-289

Maier, H. Dietz, A., Zielinski, D., Junemann, K.H., Heller, W.D. (1990):

Risk factors for squamous epithelial carcinoma of the mouth, the oropharynx, the hypopharynx and the larynx

Dtsch Med Wochenschr 115: 850-853

Maier, H., Gewelke, U., Heller, W.D. (1991):

Occupational exposure to hazardous substances and risk of cancer in the area of the mouth cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx. A case control study

Laryngorhinootologie 70: 93-98

Maier, H., Gewelke, U., Dietz, A., Thamm, H., Heller, W.D., Weidauer (1992):

Laryngeal cancer and occupation – results of the Heidelberg laryngeal cancer study

HNO 40: 44-51

Maier, H., Sennewald, E., Dietz, A., Fischer, G., Gewelke, R., Heller, W.D., Kura, N., Zöller, J. (1994):

Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich – Ergebnisse der Heidelberger Fallkontrollstudien

Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften ISBN: 3-88383-337-1

Maier, H., Tisch, M. (1997):

Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study

Acta Otolaryngol Suppl 527: 160-164

Maier, H. Tisch, M., Dietz, A., Conradt, C. (1999):

Construction workers as an extreme risk group for head and neck cancer?

HNO 47: 730-736

Maier, H., Tisch, M., Kyrberg, H., Conradt, C., Weidauer, H. (2002):

Occupational hazardous substance exposure and nutrition. Risk factors for mouth, pharyngeal and laryngeal carcinomas?

HNO 50: 743-752

Matthias, C., Jahnke, V., Jones, P.W. , Hoban, P.R., Aldersea, J.E., Worrall, S.F., Fryer, A.A., Strange, R.C. (1999):

Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis

Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention: 815-823

Marquardt, H., Schäfer, S.G. (2004):

Lehrbuch der Toxikologie

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart

McDowall (1984):

A mortality study of cement workers

Brit J Indust Med 41: 179-182

McDowall (1986):

Cement workers and cancer: epidemiology at work?

Brit J Ind Med 43: 505-506

Mengesha, Y.A., Bekele, A. (1997):

Effect of acute exposure to different occupational dusts on pulmonary function indices of factory workers in Ethiopia

Afr Newslett Occup Health Saf 7: 8-9

Meo, S.A., Azeem, M.A., Ghori, M.G., Subhan, M.M. (2002):

Lung function and surface electromyography of intercostals muscles in cement mill workers

Int J Occup Med Environ Health 15: 279-287

Mögel, M., Krüger, E., Drug, H.F., Seide., A. (1998):

A new coculture-system of bronchial epithelial and endothelial cells as a model for studying ozone effects on airway tissue

Toxicol Lett 96-97: 25-32

Mwaiselage, J., Bratveit, M., Moen, B., Mashalla, Y. (2004):

Cement dust exposure and ventilatory function impairment: an exposure-response study

J Occup Environ med 46: 658-667

Mwaiselage, J., Moen, B., Bratveit, M. (2006):

Acute respiratory health effects among cement factory workers in Tanzania: an evaluation of a simple health surveillance tool

Int Arch Occup Environ Health 79: 49-56

National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) (1994):

Work-related lung disease surveillance report
CDC DHHS NIOSH, N. 94-120: 58-70

Niepolomski, W., Sosnierz, M., Wieczorek, M. (1967):

Obraz patomorfologiczny narządu oddechowego w doświadczalnej pylicy cementowej u szczurow
Medycyna Pracy 18: 369-376

Noor, H. Yap, C.L., Zolkepli, O., Faridah, M. (2000):

Effect of exposure to dust on lung function of cement factory workers
Med J Malaysia 55: 51-57

Norseth, T. (1977):

Chromium and its compounds
Occupational medicine. Chicago: Year Book Medical Publishers: 644-9

Oberdörster, G., Ferin, J., Lehnert, B.E. (1994):

Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury
Environ Health Perspect, 102: 173-179

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. (2004):

Mutagens in surface waters: a review.
Mutat Res 567: 109-149

Oleru, U.G. (1984):

Pulmonary function and symptoms of Nigerian workers exposed to cement dust
Environ Res 33: 379-85

Olsen, J., Sabroe, S. (1984):

Occupational causes of laryngeal cancer
J Epidemiol Commun Health 38: 117-121

Östling, O., Johanson, K.J. (1984):

Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA-Damages in individual mammalian cells
Biochem Biophys Res Commun 123: 291-298

Ophus, E.M., Rode, L.E., Gylseth, B., Nicholson, G., Saeed, K. (1979):

Analysis of titanium pigments in human lung tissue
Scand J Work Environ Health 5: 290-296

OSHA comments (1989):

Final Rule on Air Contaminants Project extracted from 54FR2332 et.seq
www.cdc.gov/niosh/pel88/65997-15

Oshima, S., Xu, Y., Takahama, M. (1989):

Effects of uranium ore dust on cultured human lung cells.
Environmental Toxicology and Pharmacology 5: 267-271

Park, J.W., Floyd, R.A. (1992):

Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA

Free Radic Biol Med 12: 245-250

Parmeggiani L. (1951):

Rilievi statistiche sulle pneumoconiosinella industria del cemento

Rassegna di Medicina Industriale 20: 400

Peters, A., Wichmann, H.E., Tuch, T., Heinrich, J., Heyder, J. (1997):

Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles

Am J Respir Crit Care Med 155: 1376-1383

Perderist, M., Marsh, J.P., Mossmann, B.T. (1991):

Activation of protein kinase C by crocidolite asbestos in hamster tracheal epithelial cells

Carcinogenesis 12: 1499-1502

Pisters, H. (1966):

Chrom im Zement und Chromatekzem

Zement Kalk Gips 19: 467 – 472

Piotrowski, W.J., Marczak, J., Dinsdale, D., Kurmanowska, Z., Tarasow, Y., Komos, J., Nowak, D. (2000):

Release of hydrogen peroxide by rat type II pneumocytes in prolonged culture

Toxicol In Vitro 14: 85-93

Pope, C.A., Bates C.V., Raizenne, M.E. (1995):

Health effects of particulate air-pollution: Time for reassessment?

Environ Health Perspect 103: 472-480

Prosperi, G., Barsi, C. (1957):

Sulle pneumoconiosis dei lavatori del cemento

Rassegna di Medicina Industriale 26: 16

Rafnsson, V., Johannesdottir, S.G. (1986):

Mortality among masons in Iceland

Brit J Indust Med 43: 522-525

Rafnsson, V., Gunnarsdottir, H., Kiilunen, M. (1997):

Risk of lung cancer among masons in Iceland

Occup Environ med 54: 184-188

Raithel, H.-J. (1987):

Toxizität und Karzinogenität der Chromate – eine kurze Übersicht zum gegenwärtigen Kenntnisstand

Zbl Arbeitsmedizin 37: 184 –191

Rajaei-Behbahani, N., Schmezer, P., Risch, A., Rittgen, W., Kayser, K.W., Dienemann, H., Schulz, V., Drings, P., Thiel, S., Bartsch, H. (2001):

Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung Cancer
In J Cancer 95: 86-91

Rajaei-Behbahani, N., Schmezer, P., Ramroth, H., Bürkle, A., Bartsch, H., Dietz, A., Becher, H. (2002):

Reduced poly(ADP-ribosyl)ation in lymphocytes of laryngeal cancer patients: Results of a case-control study
Int J of Cancer 98: 780-784

Rasmussen, F.V., Borchsenius, L., Hostein, B. (1977):

Lung function and long-term exposure to cement dust
Scandinavian Journal of Respiratory Diseases 58: 252

Reichel, G. (1994):

Pneumokoniosen durch anorganische Stäube
In: Ferlinz, R. (Hrsg.): Pneumologie in Praxis und Klinik. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Repine, J.E., Bast, A., Lankhorst, I., and The oxidative stress study group (1997):

Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease
Am J Respir Crit Care Med 156: 341-357

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F.,

Kraehenbuhl, J.-P., Ricciarde-Castagnoli, P. (2001):
Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria
Nature Immunology 2: 361-367

Ress, N.B., Chou, B.J., Renne, R.A., Dill, J.A., Miller, R.A., Roycroft, J.H., Hailey, J.R., Haseman, J.K., Bucher, J.R. (2003):

Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F1 mice
Toxicol Sci 74: 287-96

Ribeiro, D.A., Sugui, M.M., Matsumoto, M.A., Duarte, M.A.H., Marques, M.E.A., Salvadori, D.M.F. (2006):

Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101: 258-61

Rothen-Rutishauser, B.M., Kiama, S.G., Gehr, P., (2005):

A Three-Dimensional Cellular Model of the Human Respiratory Tract to Study the Interaction with Particles.
Am J Respir Cell Mol Biol 32: 281-289

Roller, M. (2008):

Untersuchung zur krebserzeugenden Wirkung von Nanopartikeln und anderen Stäuben
Abschlussbericht Projekt F 2083
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Rom, W., Crystal, R.G. (1991):

Consequences of chronic inorganic dust exposure
In: Crystal, R.G.; West, J.B.: The Lung Scientific Foundation; Raven Press, New York: 1885-1897

Schins, R.P.F. (2002):

Mechanisms of Genotoxicity of Particles and Fibers
Inhal Toxic, Pul Med, 14: 57-78

Schins, R.P.F., Knaapen, Ad M., Cakmak, G.D., Shi, T., Weishaupt, C., Borm, P.J.A. (2002):

Oxidant-induced DNA damage by quartz in alveolar epithelial cells
Mutation Research 517: 77-86

Schmezer, P., Rajaei-Behbahani, N., Risch, A., Rittgen, W., Kayser, K.W., Dienemann, H., Schulz, V., Drings, P., Thiel, S., Bartsch, H. (2001):

Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes
Mutagenesis 16: 25-30

Shi, X., Mao, Y., Daniel, L.N., Saffiotti, U., Dalal, N.S., Vallyathan, V. (1994):

Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation
Environ Health Perspect 102: 149-154

Shukla, A., Timblin, C., Berube, K., Gordon, T., McKinney, W., Driscoll, K., Vacek, P., Mossman, B.T. (2000):

Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation *in vitro*
Am J Respir Cell Mol Biol 23: 182-187

Singh, N., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988):

A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.
Experimental Cell Research 175: 184-191

Smailyte, G., Kurtinatis, J., Andersen, A. (2004):

Mortality and cancer incidence among Lithuanian cement producing workers
Occup Environ Med 61: 529-534

Smith, K.R., Veranth, J.M., Lighty, J.S., Aust, A.E. (1998):

Mobilization of iron from coal fly ash was dependent upon the particle size and the source of Coal
Chem Res Toxicol 11: 1494-1500

Smith, K.R., Veranth, J.M., Hu, A.A., Lighty, J.S., Aust, A.E. (2000):

Interleukin-8 levels in human lung epithelial cells are increased in response to coal fly ash and vary with the bioavailability of iron, as a function of particle size and source of coal

Chem Res Toxicol 13: 118-125

Smith, A.H., Handley, M.A., Wood, R. (1990):

Epidemiological Evidence Indicates Asbestos Causes Laryngeal Cancer

J of Occupational Medicine 32: 499-507

Sorokin, S.P., Brain, J.D. (1975):

Pathways of clearance in mouse lungs exposed to iron oxide aerosols

Anat Rec 181: 581-626

Speit, G., Dennog, C. (2000):

Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung von oxidativem Streß

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

Stearns, R.C., Paulauskis, J.D., Godleski, J.J. (2001):

Endocytosis of Ultrafine Particles by A549 Cells

Am J Respir Cell Mol Biol 24: 108-115

Steerenberg, P.A., Zonnenberg, J.A., Dormans, J.A., Joon, P.N., Wouter, I.M., van Bree, L., Scheepers, P.T., Van Loveren, H. (1998):

Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro

Exp Lung Res 24: 85-100

Stern, F., Lehman, E., Ruder, A. (2001):

Mortality among unionized construction plasterers and cement masons

Am J Ind Med 39: 373-388

Stone, V., Jones, R., Rollo, K., Duffin, R., Donaldson, K., Brown, D.M. (2004):

Effect of coal mine dust and clay extracts on the biological activity of the quartz surface

Toxicol Lett 149: 255-259

Stredrick, D.L., Stokes, A.H., Worst, T.J., Freeman, W.M., Johnson, E.A., Lash, L.H., Aschner, M., Vrana, K.E. (2004):

Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells

Neurotoxicology 25: 543-553

Szadkowska-Stanczyk, I., Szymczak, W. (2001):

Nested case-control study of lung cancer among pulp and paper workers in relation to exposure to dusts

Am j Ind Med 39: 547-556

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rofas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F. (2000):**
Single cell gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.
Environmental and Molecular Mutagenesis 35: 206-221
- US Department of Health and Human Services (2001):**
Public Health Service, National Toxicology Program
9th Report on carcinogens
- Vaccarezza, R.A. (1950):**
Hygiene and Health in the Portland Cement Industry: Investigation in the Argentine Factories
Buenos Aires, Guillermo Kraft Ltda
- Van Klaveren, R.J., Toelant, C., Boogaerts, M., Demedts, M., Nemery, B. (1997):**
Involvement of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in superoxide anion and hydrogen peroxide generation by rat type II cells
Thorax 52: 465-471
- Van den Oever, R. (1996):**
Occupational exposure to dust and sinonasal cancer. An analysis of 386 cases reported to the N.C.C.S.J. Cancer Registry
Acta Oto-Rhino-Larynggol Bel 50: 19-24
- Vanhee, C., Gosset, P., Boitelle, A., Wallaert, B., Tonne, A.B. (1995):**
Cytokines and cytokine network in silicosis and coal worker's pneumocosis
Eur Respir J 8: 834-842
- Varigos, G.A., Dunt, D.R. (1981):**
Occupational dermatitis. An epidemiological study in the rubber and cement industries
Contact Dermatitis 7: 105-110
- Verein Deutscher Zementwerke e.V. (1999):**
Die Bedeutung des Chromates in Zementen und zementhaltigen Zubereitungen
Sachstandsbericht, Forschungsinstitut der Zementindustrie
- Vestbo, J., Rasmussen, F.V. (1989):**
Long-term exposure to cement dust and later hospitalization due to respiratory disease
Int Arch of Occup and Environ Health 62: 217-220
- Vestbo, J., Knudsen, K.M., Raffnson, E., Korsgaard, B., Rasmussen, F.V. (1991):**
Exposure to cement dust at a Portland cement factory and the risk of cancer
Br J Ind Med 48: 803-807

Wahrheit, D.B., Hartsky, M.A. (1993):

Role of alveolar macrophage chemotaxis and phagocytosis in pulmonary clearance responses to inhaled particles: comparisons among rodent species
Microsc Res Tech 26: 412-22

WHO (2001):

Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. Concise International Chemical Assessment Document 29, Genf
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Woitowitz, H.-J. In: Valentin, H. (1985):

Die gesetzlichen Berufskrankheiten, Erkrankungen der Atemwege. In: Arbeitsmedizin, Band 2. Berufskrankheiten
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York: 184-228

Yang, C.Y., Huang, C.C., Chang, I.C., Lee, C.H., Tsai, J.T., Ko, Y.C. (1993):

Pulmonary function and respiratory symptoms of Portland cement workers in southern Taiwan
Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi 9: 186-192

Ye, J., Wang, S., Leonard, S.S., Sun, Y., Butterworth, L., Antonini, J., Ding, M., Rojanasakul, Y.,

Vallyathan, V., Castranova, V., Shi, X. (1999):

Role of reactive oxygen species and P53 in chromium(VI)-induced *apoptosis*
M Bio Chem 274: 34974-34980

Zagraniski, R.T., Kelsey, J.L., Walter, S.D. (1986):

Occupational risk factors for laryngeal cancer
Am J Epidemiol 124: 67-76

Zatonski, W., Becher, H., Lissowska, J., Wahrendorf, J. (1991):

Tobacco, alcohol and diet in the etiology of laryngeal cancer. A population-based case-control study
Cancer Causes Control 2: 3-10

Zhang, C., Gminski, R., Wenqing, L., Van Schooten, Mersch-Sundermann, V. (2009):

Size separated cement dust ($\phi = 1 - 2.5 \mu\text{m}$) is not genotoxic but enhances benzo(a)pyrene induced genotoxicity in human epithelial A549 cells in cytochalasin block micronucleus test in vitro
In Vorbereitung

Zhong, B., Whong, W., Ong, T. (1997):

Detection of mineral-dust-induced DNA damage in two mammalian cell lines using the alkaline single cell gel/comet assay
Mut Res. 393: 181-187

Quellenangaben aus dem Internet:

<http://www.cdc.gov/niosh/pel88/65997-15.html>

(Aufruf der Seite: 3.3.2008)

Deutsches Krebsforschungsinstitut

<http://www.dkfz.de>

(Aufruf der Seite: 3.3.2008; Letzte Aktualisierung: 9.11.2007; Verfasser: Dr. Sibylle Kohlstädt)

<http://www.konrad-fischer-info.de/2beton15.htm>

(Aufruf der Seite: 3.3.2008)

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol49/volume49.pdf>

(Aufruf der Seite: 28.2.2008)

U.S. Department of Health and Human Services

National Toxicology Program

<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s161sili.pdf>

(Aufruf der Seite: 28.2.2008; Letzte Aktualisierung: 9.3.2005)

http://www.stbg.de/sich_ges/staub/bk.htm

(Aufruf der Seite: 13.2.2008)

<http://www.umweltbundesamt.de/index.htm>

(Aufruf der Seite: 13.2.2008; Letzte Aktualisierung: 15.1.2008)

<http://www.vdz->

[online.de/fileadmin/gruppen/vdz/3LiteraturRecherche/UmweltundRessourcen/chromat/CHROMAT_01.pdf](http://www.vdz-online.de/fileadmin/gruppen/vdz/3LiteraturRecherche/UmweltundRessourcen/chromat/CHROMAT_01.pdf)

(Aufruf der Seite: 28.2.2008)

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. V. Mersch-Sundermann für die Überlassung des interessanten Themas der vorliegenden Arbeit, die immer freundliche Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung so wie die Bereitstellung der finanziellen und technischen Mittel.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Richard Gminski bedanken, für die gute Beratung, die hilfreichen Anregungen und Diskussionen zu dieser Dissertation, sowie die stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Laufe dieser Arbeit.

Herrn Dr. Winfried Ebner danke ich für die freundliche Unterstützung und Beratung und das Korrekturlesen.

Mein großer Dank gilt ebenfalls meiner lieb gewonnenen Kollegin Zhang Cong für die unermüdliche Hilfe bei den anfallenden Arbeiten im Labor und die vielen Stunden beim Auswerten vor dem Fluoreszenzmikroskop.

An Evelyn Lamy ein Dankeschön für die vielen guten Anregungen und fachlichen Hintergrundinformationen sowie die Hilfe bei der Bildbearbeitung. Weiterhin ein Dankeschön an alle Mitarbeiter des Instituts für Innenraum- und Umwelttoxikologie, insbesondere Frau Inge Bechtum und Anja Schnecko.

Danken möchte ich auch ganz besonders meinen geliebten Eltern, für die allgegenwärtige Unterstützung und Geduld. Weiterhin gilt mein Dank meinem Partner Torsten und meinen Freunden Marina Groh, Sandra Roth, Jens Weidl, Heike Melchior, Elisabeth Nowak, Christina Schichowsky und Claudia Willitsch. Ihr habt mich immer motiviert positiv nach vorne zu schauen und darin bestärkt meinen Weg zu gehen!

Fürs Korrekturlesen danke ich tausendmal Marina, Sandra, Sabine Gruber und Sabrina Wolter!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**